HAL
open science

Encapsulation de systèmes enzymatiques d'intérêt alimentaire

Muriel Jacquot

To cite this version:

Muriel Jacquot. Encapsulation de systèmes enzymatiques d'intérêt alimentaire. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2002. Français. NNT : 2002INPL041N . tel-01749771

HAL Id: tel-01749771

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749771

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

J360311243 02INPL041N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

[M] 2002 JACQUOT, M.

Laboratoire de Bioprocédés Agroalimentaires

THESE

Présentée à l'INPL par

Muriel JACQUOT

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

spécialité : Biotechnologies et Industries Alimentaires

Sujet :

Encapsulation de systèmes enzymatiques d'intérêt alimentaire

Soutenance publique le 8 juillet 2002
devant la commission d'examen

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

Membres du jury :

Rapporteurs : **Jean François CAVIN**, Professeur
John DODDS, Professeur

Examinateurs : **Klaus EICHLER**, Industriel
Pierre GERMAIN, Professeur
André MICLO, Professeur
Denis PONCELET, Professeur

Remerciements,

Cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire de Bioprocédés Agroalimentaires, je tiens à remercier Monsieur le Professeur Pierre Germain, directeur du laboratoire, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche pendant mon DEA puis pour m'avoir de nouveau apporté son soutien pour ma thèse. En outre, je le remercie pour avoir accepté de juger ce travail.

Je témoigne toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Denis Poncelet pour son encadrement durant ma thèse, mais surtout pour les opportunités, les contacts qu'il m'a procurés ainsi que la confiance qu'il m'a témoignée durant ces quatre années. Je ne conserverai que des souvenirs positifs de cette direction qui s'apparente à une réelle collaboration.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur le Professeur André Miclo qui a accepté de suivre ce travail après le départ de Monsieur Poncelet.

J'exprime mes sincères remerciements à Messieurs les Professeurs John Dodds et Jean François Cavin pour avoir consenti de juger ce travail en qualité de rapporteurs.

J'ai une pensée toute particulière pour Monsieur Klaus Eichler de GLATT Pharmatech qui m'a apporté une aide et un soutien décisifs dans la réalisation de cette étude. Je le remercie pour m'avoir accueillie dans son entreprise, m'avoir fait confiance et avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

Parmi les nombreuses autres personnes qui ont eut un rôle actif dans cette thèse, je souhaite citer plus particulièrement Monsieur Philippe De Donato, Monsieur Jean-Bernard Millière, Madame Marie-Noëlle Pons et Madame Anne-Marie Revol-Junelles, pour leur aide et leurs conseils, sans oublier Madame Lecœur et Monsieur Prou de CNI (Colloids Natural International) pour leur gentillesse, leurs compétences et leur accueil au sein de leur entreprise.

Pour finir, j'adresse toute ma reconnaissance et mon amitié aux personnes qui m'ont aidée et supportée, dans les deux sens du terme, tout au long de ces années. La liste serait trop longue à établir mais elle contiendrait à coup sûr, Mademoiselle Michèle Turban, Benji, Estelle, Françoise, Lena, Manu, Maxime, Fred, Pierre, Stéphane, Sabine, Ysabelle sans oublier, d'ailleurs comment l'oublier, Delphine pour sa bonne humeur, son aide et son soutien.

Je réserve le mot de la fin pour mes parents qui, à aucun moment, n'ont douté de moi et m'ont toujours soutenue tout au long de mon parcours qui ne fut pas sans écueils. Je leur dédie ce manuscrit ainsi qu'à Léo et Jean Pierre.

Sommaire

INTRODUCTION 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 7

I. MISE AU POINT DE LA PROCEDURE D'ENCAPSULATION 9

I.1. La formulation 10
I.1.1. L'alginate 12
I.1.2. Les carraghénanes 13
I.1.3. La gomme acacia 14
I.2. Les différentes techniques d'encapsulation 17
I.2.1. Les techniques d'émulsion 18
I.2.2. Les techniques de coacervation 22
I.2.3. Les techniques d'extrusion 24
I.2.4. Les techniques de spray 26

II. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES MICROPARTICULES 32

II.1. La structure 32
II.2. La taille 34
II.3. Le taux d'encapsulation 35
II.4. Les interactions avec l'environnement 35

III. LE SYSTEME LACTOPEROXYDASE / THIOCYANATE / PEROXYDE D'HYDROGENE OU SYSTEME LP (LPS) 37

III.1. La lactoperoxydase (LPO, EC : 1.11.1.7) 40
III.1.1. Caractéristiques physico-chimiques 40
III.1.2. Stabilité 41
III.2. Le thiocyanate 44
III.3. Le peroxyde d'hydrogène 45
III.4. Mode d'action du système lactoperoxydasique 46
III.5. Utilisation du système LP 49

IV. LE SYSTEME GLUCOSE OXYDASE / GLUCOSE 51

IV.1. Caractéristiques physico-chimiques 52
IV.2. Stabilité 53
IV.3. Développements et utilisations 53

V. LA MICROENCAPSULATION APPLIQUEE A LA LACTOPEROXYDASE 55

VI. ALIMENTATION ET CONTAMINATION BACTERIENNE 57

MATERIEL & METHODES 60

I. DOSAGES ENZYMATIQUES ET CHIMIQUES 61

I.1. Dosage spectrophotométrique du glucose 61
I.1.1. Principe 61
I.1.2. Composition des réactifs du kit 62
I.1.3. Milieu réactionnel 62
I.1.4. Gamme étalon 62

I.2. Dosage spectrophotométrique du thiocyanate 63
I.2.1. Principe 63
I.2.2. Milieu réactionnel 63
I.2.3. Mode opératoire 64
I.2.4. Gamme étalon 64
I.3. Dosage de l'activité lactoperoxydasique 64
I.3.1. Principe 65
I.3.2. Milieu réactionnel 65
I.3.3. Mode opératoire 65
I.3.4. Calcul de l'activité enzymatique : AE (UI/mL) 66
I.4. Dosage de l'activité glucose oxydasique 66
I.4.1. Principe 66
I.4.2. Milieu réactionnel 67
I.4.3. Mode opératoire 67
I.4.4. Calcul de l'activité enzymatique : AE (UI/mL) 67
I.5. Réalisation des courbes de dissolution des poudres 68

II. MESURES PHYSICO-CHIMIQUES 69

II.1. Observations macro et microscopique des poudres 69
II.2. Détermination de l'humidité résiduelle 69
II.3. Réalisation des isothermes de sorption 69
II.3.1. Principe 69
II.3.2. Protocole 70
II.4. Etude de la morphologie par analyse d'images 70
II.4.1. Prétraitement des images 71
II.4.2. Descripteurs généraux de forme 72
II.5. Etude de la répartition granulométrique des poudres 74
II.6. Analyse chimique par réflexion diffuse par infrarouge 74
II.6.1. Principe 75
II.6.2. Protocole 76
II.7. Structure chimique par diffraction des rayons X 76
II.7.1. Principe 76
II.7.2. Protocole 77
II.8. Propriétés rhéologiques des poudres 77
II.8.1. Détermination de l'indice de « flowability » 78
II.8.2. Détermination de l'indice de « floodability » 83

III. METHODES MICROBIOLOGIQUES 86

III.1. Microorganismes 86
III.2. Systèmes enzymatiques antibactériens 87
III.2.1. Choix des systèmes antibactériens 87
III.2.2. Composition des solutions à sécher 87
III.3. Méthode des cercles d'inhibition 89
III.3.1. Principe 89
III.3.2. Protocole 90
III.4. Méthode de saupoudrage des microbilles 91

IV. METHODES DE SECHAGE DES SOLUTIONS ENZYMATIQUES 91

IV.1. Lyophilisation 91
IV.2. Atomisation 92
IV.3. Granulation 93

V. PELLICULAGE EN LIT D'AIR FLUIDISE 93

V.1. Principe 93
V.2. Protocole 94

RESULTATS & DISCUSSION 96

I. DEFINITION DES CONDITIONS D'ETUDE 97

I.1. Choix du modèle 98
I.2. Conformation de la microbille 99
I.3. Réalisation du noyau sec 101
I.3.1. Choix du polymère 101
I.3.2. Choix des méthodes de séchage 102
I.3.3. Composition des solutions 103

II. EFFET DE LA METHODE DE SECHAGE SUR LES PROPRIETES DES NOYAUX SECS OBTENUS 106

II.1. Caractérisation morphologique 107
II.1.1. Observations macro et microscopique 107
II.1.2. Caractérisation morphologique quantitative 109
II.1.3. Distribution de taille 110
II.2. Caractérisation physico-chimique des poudres 112
II.2.1. Humidité résiduelle 112
II.2.2. Isothermes de sorption 113
II.3. Analyse de surface par spectrométrie infrarouge 116
II.4. Analyse de la structure atomique par rayons X 120
II.5. Cinétiques de dissolution des poudres 122

III. CARACTERISATION RHEOLOGIQUE DES POUDRES 125

III.1. Détermination des indices de « flowability » et de « floodability » 125
III.2. Calcul des ratios d'Hausner 127

IV. CHOIX DE LA METHODE DE PRODUCTION DES NOYAUX SECS EN VUE DU PELLICULAGE 129

V. PELLICULAGE DE LA GLUCOSE OXYDASE, LA LACTOPEROXYDASE ET DE DEUX ENROBAGES SECONDAIRES 131

V.1. Caractérisation morphologique 132
V.1.1. Observations macro et microscopique 132
V.1.2. Etude de la morphologie par analyse d'images 134
V.1.3. Distribution de taille 135
V.2. Caractérisation physico-chimique des microbilles 137
V.2.1. Humidité résiduelle 137
V.2.2. Isothermes de sorption 138
V.2.3. Analyse de surface par spectrométrie infrarouge 139
V.2.4. Courbes de dissolution 147
V.3. Caractérisation rhéologique des microbilles 148
V.4. Influence du pelliculage sur le ratio d'Hausner 151

VI. CARACTERISATION MICROBIOLOGIQUE DES MICROBILLES DE LPS 153

VI.1. Activité antibactérienne du LPS utilisant des substrats encapsulés. 154
VI.1.1. Système enzymatique témoin (SH) 156
VI.1.2. La composition LPS « classique » (S) 158
VI.1.3. Substitution du thiocyanate par de l'iodure de potassium 159
VI.2. Détermination des quantités d'enzymes en vue du pelliculage 160
VI.2.1. Influence de la concentration en glucose oxydase (GOD) 161
VI.2.2. Optimisation des concentrations en enzymes 164
VI.2.3. Diffusion du glucose et du thiocyanate dans la gélose 165

VII. EFFICACITE ANTI-LISTERIA DES MICROBILLES DE LPS 169

VII.1. Influence de la composition du noyau sur l'activité anti-*Listeria monocytogenes* 169
VII.1.1. Microbilles de LPS « classique » 169
VII.1.2. Microbilles de LPS « substitué » 172
VII.1.3. Influence de la présence d'un enrobage supplémentaire 174
VII.1.4. Détermination statistique des comportements 177
VII.2. Saupoudrage des microbilles 179
VII.2.1. Saupoudrage de quantités croissantes de microbilles 179
VII.2.2. Dilution des microbilles dans la gomme acacia (GA) 182

VIII. INFLUENCE DU PELLICULAGE SUR LA STABILITE DU LPS ENCAPSULE 184

IX. SPECTRE D'EFFICACITE ANTIBACTERIENNE 186

CONCLUSION 193

ANNEXE 201

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 203

INTRODUCTION

A l'heure de l'union européenne et de la monnaie unique, le consommateur occidental se trouve devant une palette de choix de plus en plus grande. Les produits, tant dans l'alimentaire que dans d'autres domaines, se doivent d'être efficaces, peu coûteux et surtout d'une qualité irréprochable, car la concurrence est de plus en plus dure. En opposition avec cet élan d'ouverture, une impression de recadrage sur des valeurs plus concrètes apparaît. Les termes « naturel », « authentique », « terroir », font vendre car le consommateur a besoin de retrouver des repères plus proche de lui et de son quotidien. Les produits biologiques sont en plein essor. Les dogmes « qualité » et « sécurité alimentaire », cohabitent avec les mentions « sans conservateur » ou « 100% biologique ».

Pour faire face à ce nouvel environnement, le producteur doit s'adapter aux contradictions du consommateur qui souhaite un poisson frais ou des salades prêtes à l'emploi capables de se conserver plus d'une semaine au réfrigérateur. Les nouveaux conservateurs doivent être naturels avec un spectre d'action très large, une durée de vie longue et sans interaction avec le produit. Ce challenge est parfois difficile à remplir et l'encapsulation peut, dans de nombreux cas, être une solution pour obtenir un compromis entre ces différents impératifs.

Les techniques employées dans le domaine de l'encapsulation sont issues de la pharmacie. De nombreuses méthodes ont été mises au point pour protéger les principes actifs. Aujourd'hui, de nouvelles applications apparaissent dans l'agroalimentaire, l'expérience des pharmaciens permettant une évolution rapide des techniques.

Cette contribution a pour objectif la mise au point d'une microbille contenant un système multienzymatique complet à usage alimentaire compatible avec une utilisation industrielle et à multiples applications. L'association enzymatique retenue comme modèle est le système lactoperoxydase / thiocyanate / peroxyde d'hydrogène associé à un générateur enzymatique d'H_2O_2, le couple glucose/glucose oxydase. Ce système produit, majoritairement, un puissant agent antibactérien, appelé hypothiocyanite.

L'utilisation de cet hypothiocyanite est délicate car il est peu stable et sa purification n'est pas encore au point. C'est pourquoi le système multienzymatique producteur lui est souvent préféré. Parallèlement, à ce système lactoperoxydasique que l'on peut qualifier de « classique », deux variantes sont aussi étudiées. La première est un système simplifié sans substrat pour la lactoperoxydase. Il permet la quantification de l'activité antibactérienne due à la production de peroxyde d'hydrogène. C'est donc un système témoin. La seconde variante fait intervenir de l'iodure de potassium à la place du thiocyanate de potassium, elle est appelée système « substitué ». Cette modification entraîne des changements d'activité antibactérienne mais aussi de propriétés physico-chimiques Ce sont donc trois complexes enzymatiques qui sont étudiés.

Après avoir défini la mise en œuvre d'une procédure d'encapsulation dans la revue bibliographique, la mise au point de la microbille débute par la définition des différentes conditions d'étude. Suite à cette réflexion préliminaire, la réalisation proprement dite commence par la création d'un noyaux sec contenant les substrats des complexes multienzymatiques. La détermination des méthodes et des matériaux employés s'effectue toujours dans le respect de la législation du domaine alimentaire, sans perdre de vue l'application industrielle. Trois méthodes de production ont été retenues, l'atomisation, la lyophilisation et la granulation. Le choix final s'est fait à la suite à d'une caractérisation physico-chimique des noyaux basée sur une étude morphologique, physique et rhéologique.

La deuxième étape de la réalisation de la microbille correspond à l'addition des enzymes et d'enrobages de régulation et de protection. Les microbilles obtenues sont ensuite caractérisées au niveau physico-chimique comme précédemment.

Parallèlement, des études microbiologiques utilisant comme cible *Listeria monocytogenes* sont effectuées tout d'abord sur les noyaux pour rechercher l'impact de l'encapsulation sur la disponibilité des substrats pour les enzymes, puis sur les microbilles.

Enfin, leur activité antibactérienne est testée contre plusieurs souches de contamination et d'altération communément rencontrées dans les produits alimentaires.

La réalisation de la microencapsulation de ces systèmes enzymatiques modèles est intéressante pour aider à leur développement industriel mais aussi pour démontrer l'intérêt du concept mis au point. En effet les microbilles réalisées sont facilement modulables et donc extrapolables à d'autres complexes multienzymatiques hydrophiles et à d'autres domaines d'application comme la pharmacie ou la cosmétique.

Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

- ***Publications dans des journaux internationaux***

Jacquot M., Revol-Junelles A.M., Millière J.B., Miclo A., Poncelet D., 2000. Anti *Listeria monocytogenes* activity of the lactoperoxidase system (LPS) using encapsulated substrates. Minerva Biotecnologica, 12 :301-304

Jacquot M., de Donato Ph., Barres O., Pons M.N., Scher J., Miclo A., Poncelet D., 2002. Physico-chemical characterisation of the lactoperoxidase system (LPS) powders : comparison of two drying techniques. Powder Technology, ***in press***

- ***Chapitre de livre***

Poncelet D., Dulieu C., Jacquot M., 1999. Description of the immobilisation procedures. In "Immobilized Cells", Wijffels R. Ed., Springer Lab Manual, Chap. III, 15-30

- ***Communications orales dans des congrès internationaux***

« Enzyme coating, case study », M. Jacquot, A. Miclo, D. Poncelet (2002). Workshop n°53 « Nutraceuticals & Probiotics » GLATT Technology Training Center, Binzen, Allemagne

« Self sufficient microbead of lactoperoxydase system study », M. Jacquot, A. Miclo, D. Poncelet (2001). 13th International Symposium on microencapsulation, Angers France

« Combined enzymes and substrates in a single bead for antibacterial agent production on food » Muriel Jacquot, André Miclo, Denis Poncelet (2001) 221st ACS national meeting, San Diego, EU

« Enzymes coating, application to lactoperoxidase system » M. Jacquot, A. Miclo, D. Poncelet (2001). Workshop n°40 « Particle coating for food and nutraceuticals » GLATT Technology Training Center, Binzen, Allemagne

« Achievement of a single bead containing the lactoperoxidase system and its peroxide hydrogen generator » M. Jacquot, A. Miclo, D. Poncelet (2001) Bioencapsulation IX, Varsovie Pologne

« Polyelectrolyte complex microcapsules and their mechanical resistance evaluation » D. Poncelet, Y. Bertrand, C. Dhullem, M. Jacquot, C. Dulieu (1999) Bioencapsulation VIII, Trondheim, Norvège

- ***Communication orale dans un séminaire national***

« Encapsulation du système lactoperoxydase/thiocyanate/ H_2O_2 » M. Jacquot, A. Miclo, D. Poncelet (2002). Séminaire de l'école doctorale RP2E

- ***Communications affichées avec actes dans des congrès nationaux***

« Encapsulation du système lactoperoxydase / thiocyanate/peroxyde d'hydrogène (LPS) et son générateur d'H_2O_2 », M. Jacquot, A. Miclo, D. Poncelet (2001), AGORAL 2001, Dijon, France, 249-254,

« Caractérisation physico-chimique des poudres obtenues par deux méthodes de séchage dans le but d'activer le système lactoperoxydase / thiocyanate / peroxyde d'hydrogène (LPS) », M. Jacquot, A. Miclo, D. Poncelet (2001) 3e Colloque Science et Technologie des poudres, Nancy, France 15 : 161-166

- ***Communications affichées dans des congrès internationaux***

« Use of Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) Spectroscopy to understand microbead internal organisation » M. Jacquot, Ph. De Donato, A. Miclo, D. Poncelet (2002) COST 840 & Xth International BRG Workshop on Bioencapsulation Cell Physiology and Interaction of biomaterials and Matrices, Prague, Czech Republic

« Use of acacia gum to decrease hygroscopicity of potassium thiocyanate so as forming a capsule containing the entire system lactoperoxidase / thiocyanate / hydrogen peroxide (LPS) », M. Jacquot, A. Miclo, D. Poncelet (2000) « Bioencapsulation: methods and resistance evaluation and Manipulation of microparticles in ultrasonic waves » COST, TMR joint meeting, Vienne, Autriche

« Antibacterial activity of lactoperoxidase / thiocyanate / hydrogen peroxide system (LPS) using encapsulated substrates », M. Jacquot, A. Miclo, D. Poncelet (2000) « Controlled Release Society, third conference », Paris, France

Revue Bibliographique

Le domaine de la microencapsulation est vaste. Il touche tous les secteurs d'activité de l'industrie et le nombre de ses applications ne cesse de s'accroître. Il regroupe de très nombreuses méthodes ce qui rend parfois le choix du novice difficile. C'est pourquoi l'application d'une méthode d'encapsulation doit passer par la mise au point d'une procédure reposant sur :

- ✧ la détermination de la formulation
- ✧ le choix de la méthode
- ✧ la connaissance des propriétés du matériau à encapsuler
- ✧ la définition du domaine d'application.

Il est donc impératif de correctement définir l'objectif de l'encapsulation et de connaître les propriétés du matériel à encapsuler pour éviter sa dénaturation ou sa destruction lors de l'expérience. Le choix du ou des polymères employés doit être fait dans le respect du cahier des charges du secteur d'application. Enfin, il est important de connaître les contraintes économiques de ce secteur pour évaluer la viabilité industrielle du procédé.

Cette revue bibliographique a été organisée dans ce sens. Elle reprend les différents points de la mise en œuvre d'une procédure en s'attardant sur les principales méthodes employées et leurs influences sur les particules obtenues. Ensuite, les propriétés du système lactoperoxydase / thiocyanate / peroxyde d'hydrogène sont étudiées ainsi que celles du générateur enzymatique de peroxyde d'hydrogène. Enfin, le travail est replacé dans son contexte économique par l'étude de l'impact des contaminations bactériennes sur le secteur agroalimentaire en s'intéressant plus spécifiquement aux contaminations dues à *Listeria monocytogenes*.

I. MISE AU POINT DE LA PROCEDURE D'ENCAPSULATION

Le domaine de la microencapsulation regroupe l'ensemble des technologies de production de microparticules constituées d'un matériau enrobant et d'un principe actif. Ce dernier peut être de nature très diverse comme un arôme, un composé chimique, des cellules ou une enzyme. L'objectif de l'encapsulation peut aussi être très variable. Un composé actif peut par exemple être encapsulé afin de le protéger, de faciliter son utilisation ou d'améliorer ses performances.

Dans le domaine de l'agroalimentaire, l'encapsulation est principalement utilisée pour :

✧ augmenter la durée de vie des produits tels que les arômes, en les protégeant de l'évaporation ou de l'oxydation (Anon, 1996 ; Man *et al.*, 1999)

✧ stabiliser certains composés sensibles, comme les vitamines

✧ masquer un goût désagréable par exemple celui de certains minéraux

✧ prévenir des réactions indésirables, comme le brunissement

✧ faciliter la manipulation des produits par la mise en œuvre d'une formulation sèche (Darrington, 1999).

Avant de mettre en œuvre une procédure d'encapsulation, il est nécessaire de définir quelques critères tels que :

✧ **le domaine d'application** : les contraintes rencontrées en agroalimentaire sont différentes de celles de la cosmétique, de la pharmacie ou de la chimie,

✧ **l'objectif de l'encapsulation** : modifier les propriétés d'une substance, la protéger du milieu environnant, cibler son lieu d'action ou encore contrôler sa libération,

✧ **les contraintes économiques du secteur d'activité** : les produits à haute valeur ajoutée sont rarement développés dans le domaine alimentaire, contrairement au domaine pharmaceutique ou cosmétique (Eichler, 2001).

Ces différentes considérations prises en compte, la mise au point de la procédure d'encapsulation peut débuter.

I.1. La formulation

Le choix des matériaux se fait toujours en regard du cahier des charges du domaine d'application. En agroalimentaire, les polymères doivent appartenir à une liste positive d'autorisation, être comestibles, non réactifs et souvent sans goût particulier. De plus, le passage à une production industrielle implique un coût modéré. Par contre dans des domaines comme la pharmaceutique, le polymère se doit simplement d'être physiologiquement acceptable et biodégradable comme les polymères et co-polymères d'acide lactique qui sont dégradés en acide lactique composant naturel des fluides biologiques (Finch, 1993).

Les matériaux utilisés peuvent être d'origines diverses : naturelle, synthétique ou semi synthétique. Dans le domaine de l'agroalimentaire, la tendance actuelle favorise la mise en oeuvre de procédés faisant intervenir des matériaux naturels, c'est pourquoi seuls les biopolymères les plus fréquemment utilisés en alimentaire sont récapitulés dans le Tableau 1. Alginate, carraghénane et gomme acacia sont les trois polysaccharides les plus communément employés (Kester & Fennema, 1986). C'est pourquoi, seuls ces trois matériaux seront développés.

En plus des polymères, la formulation peut faire intervenir des additifs et ce quel que soit le procédé. En effet, il est possible d'envisager l'emploi de :

✧ **tensioactifs** pour stabiliser les émulsions

✧ **dispersants** pour homogénéiser une suspension

✧ **antimottants** pour améliorer les propriétés rhéologiques des formulations sèches

✧ **cryoprotecteurs** tels que les polysaccharides.

Nom de l'additif	*Origine*	*Classe*	*SIN pour les additifs*
Alginates	extrait d'algues	additif	400
Caroube	extrait de graines	additif	410
Carraghénane	extrait d'algues	additif	407
Caséine	animale	auxiliaire cat. 2	
Cire d'abeille	animale	additif	901
Dérivés d'amidon	extrait de céréales	additif	14--
Dérivés de cellulose	végétale	additif	46-
Gélatine	animale	auxiliaire cat. 2	
Gomme acacia	exsudat de plantes	additif	414
Gomme guar	extrait de graines	additif	412
Gomme xanthane	extrait de microorganismes	additif	415
Pectine	extrait de sous produits végétaux	additif	440

Tableau 1 : liste non exhaustive des principaux polymères autorisés en industrie agroalimentaire, source *Codex Alimentarius* (SIN : Système International de Numérotation)

I.1.1. L'ALGINATE

L'alginate est issu d'algues brunes le plus souvent de l'espèce *Macrocystis pyrifera*. Il est composé de trois blocs polymériques : l'acide poly-β-D-mannuronique (M), l'acide poly-α-L-guluronique (G) et un dernier bloc constitué alternativement de résidus d'acide D-mannuronique et d'acide L-guluronique (King, 1983). Ce sont les variations du ratio M:G qui vont rendre compte de propriétés et de fonctionnalités différentes (Cottrell, 1977).

L'alginate forme des gels par médiation ionique. En présence d'ions calcium, il conduit à la production de gels thermiquement stables (King, 1995). Ses applications sont nombreuses. Elles passent par l'utilisation en tant qu'épaississant ou gélifiant dans les spécialités laitières, les boissons, les soupes. Ses propriétés filmogènes sont étudiées pour la conservation des poissons et des champignons. Les produits traités par l'alginate de sodium présentent une meilleure conservation de leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques et leur durée de conservation est prolongée de plusieurs mois (Subhashchandra *et al.*, 1996). Toutefois, un bémol doit être apporté à ces études car en avril 2000, le Parlement Européen a refusé l'autorisation d'emploi de l'alginate de sodium comme affermissant pour des carottes râpées, estimant que cette utilisation était de nature à tromper le consommateur sur la qualité réelle du produit.

D'autres domaines exploitent les propriétés de l'alginate. Par exemple, en pharmacie, l'alginate est intégré à des pansements pour former un gel qui isole la plaie et agit comme une éponge sur les exsudats (Purilon®, Laboratoire Coloplast ou Nu-gel®, Laboratoire Johnson & Johnson)

En encapsulation, son application s'est surtout développée dans l'immobilisation de cellules animales, végétales ou bactériennes. On retrouve l'alginate dans plus de 80% des cas d'immobilisation (Poncelet, 2001).

Depuis longtemps, l'immobilisation de levure dans des billes d'alginate est étudiée pour réduire la durée de fermentation lors du procédé de fabrication de la bière (White & Portno, 1978). Depuis, le procédé a été amélioré avec, par exemple, l'ajout d'un second pelliculage d'alginate autour des billes de gel qui permet de réduire considérablement les pertes de cellules (Uemura *et al.*, 2000).

La réduction des pertes en cellules par l'ajout d'un second pelliculage a aussi été observée pour d'autres types de cellules, comme celles de *Lactococcus lactis*. En effet, l'immobilisation des cellules bactériennes dans de simples billes d'alginate de calcium conduit à un nombre de cellules libres qui atteint rapidement 10^7 UFC/ml. L'ajout d'un second pelliculage d'alginate combiné à de la poly-L-lysine permet de réduire ces pertes d'environ 50 fois, et de plus diminue fortement la vitesse d'acidification du lait (Champagne *et al.*, 1992).

L'immobilisation peut aussi être utilisée pour protéger la cellule. Par exemple, lors de la fabrication de glace ou de yaourts glacés, l'encapsulation de lactobacilles dans des billes d'alginate isole les cellules les protégeant ainsi de la destruction lors de la congélation du produit (Sheu *et al.*, 1993).

I.1.2. Les carraghenanes

Les carraghénanes sont extraits d'une algue rouge (Rhodophycée) appelée *Chondrus crispus*. Ce sont des polysaccharides linéaires constitués de sous unités, appelées carrabiose, formées de deux molécules de galactose (Moirano, 1977). Il existe trois types de carraghénane : le kappa (κ), le iota (ι) et le lambda (λ) carraghénane, possédant des propriétés différentes. Ils sont principalement utilisés pour leurs propriétés gélifiante, épaississante et stabilisante. Ils sont solubles dans l'eau mais une parfaite dissolution n'est obtenue que pour une eau chauffée aux environs de 80°C (Moirano, 1977; Groboillot *et al.*, 1994).

En alimentaire, les carraghénanes sont surtout utilisés dans le lait. Les interactions spontanées entre le carraghénane et les micelles de caséine du lait, ont favorisé le développement de nombreuses applications comme le contrôle de la cristallisation dans les desserts lactés glacés ou encore la stabilisation des suspensions dans le chocolat. Mais, on retrouve aussi les carraghénanes comme stabilisants et épaississants dans de nombreux autres produits tels que les soupes ou les viandes (Thomas, 1997).

En encapsulation, le carraghénane s'est surtout développé en tant qu'alternative à l'utilisation de l'alginate pour encapsuler des cellules. Les billes obtenues avec le kappa-carraghénane sont plus stables que celles d'alginate dans les liquides biologiques. Mais les températures élevées du procédé limitent leurs applications (Poncelet, 2001).

Le carraghénane a été étudié pour protéger les bifidobactéries de la dénaturation lors de la congélation du lait. L'immobilisation améliore significativement la survie des bactéries, d'environ 50 à 60% et les propriétés du lait congelé ne sont pas significativement modifiées (Kebary *et al.*, 1998).

Des équipes se sont aussi intéressées à l'utilisation du kappa-carraghénane pour l'immobilisation de *Saccharomyces cerevisiae* afin d'améliorer la fermentation de la bière. Les cellules immobilisées sont distribuées de façon uniforme dans les billes. Leur viabilité est de l'ordre de 90% et chute à 50% après 6 mois en fermentation continue. Cependant, malgré cette réduction de viabilité, une bière de qualité égale peut être produite après 6 mois (Pilkington *et al.*, 1999).

I.1.3. La gomme acacia.

La gomme d'acacia encore appelée gomme arabique est un exsudat visqueux obtenu par incision du tronc et des branches de certains acacias dont principalement l'Acacia du Sénégal (*Acacia senegal*).

Il existe de nombreuses espèces d'acacia (environ 700) mais les gommes utilisées en tant qu'additifs alimentaires appartiennent aux complexes botaniques *Gummifereae* (complexe Seyal) et *Vulgares* (complexe Sénégal) (Thevenet, 1997). La gomme d'acacia fait l'objet d'un commerce depuis au moins quatre mille ans et déjà au temps des égyptiens, elle entrait dans la composition des pâtes officinales (Bruneton, 1993). La poudre de gomme acacia contenant des molécules de parfums fut le premier produit basé sur une technologie d'encapsulation à être commercialisé en 1932 par la société Boake, Roberts & Co. (Arshady, 1999). En 1978, la gomme issue de l'Acacia Sénégal (L.) Willd. ou d'espèces africaines apparentées (fam. *Leguminosae*) est reportée sous le code E414 par la Communauté Economique Européenne (CEE). Depuis 1982, des études toxicologiques ont été réalisées et ont conduit à sa reconnaissance comme additif alimentaire par le JECFA (Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives) sans spécification de mention ADI (Acceptable Daily Intake) (FAO, 1982). Aux USA, elle est reconnue comme GRAS (Generally Recognize As Safe) et référencée sous le code 1841330.

La gomme d'acacia est un hydrocolloïde fortement ramifié, soluble dans l'eau jusqu'à 50 %. Sa masse moléculaire est proche d'un million de Daltons (Thevenet, 1997).

L'analyse d'une centaine de gommes issues de différents acacias montre que la composition et les caractéristiques de l'exsudat sont spécifiques à chaque espèce. De plus des variations saisonnières et géographiques peuvent apparaître (Anderson *et al.*, 1983). La structure typique d'une gomme arabique consiste en trois fractions :

✧ **fraction arabinogalactane** (AG) correspondant à 90 % de la molécule, fraction à faible poids moléculaire (300 000) et faible teneur en protéines (0,5 %)

✧ **fraction arabinogalactoprotéine** (AGP) correspondant à 9 % de la molécule, son poids moléculaire est élevé (1,5 millions) avec une forte teneur en protéines (50 %)

✧ **fraction glycoprotéique** ne représentant que 1 % de la molécule.

La fraction protéique assure la liaison entre les différents monomères d'arabinogalactane. Après hydrolyse en milieu acide, la gomme est dégradée en arabinose, galactose, rhamnose et acide glucuronique. Leurs proportions varient d'une espèce à l'autre. Un faible pourcentage de rhamnose et un rapport arabinose / rhamnose supérieur à 1 sont caractéristiques du complexe Seyal (Thevenet, 1997).

La gomme d'acacia est recherchée principalement pour ses propriétés rhéologiques, émulsifiante et filmogène (Dickinson, 1991). A faible concentration, une solution de gomme d'acacia se comporte comme un fluide newtonien. De plus, les solutions présentent une très faible viscosité en regard d'autres polysaccharides de même masse moléculaire. La gomme acacia étant un polyélectrolyte, sa viscosité varie en fonction du pH et de la force ionique (Williams *et al.*, 1990). La faible viscosité des solutions est la résultante de la présence de nombreux branchements sur un même squelette (Figure 1).

La gomme d'acacia est aussi utilisée pour réaliser des émulsions huile dans eau. Elle forme un film à l'interface eau / huile qui empêche la coalescence des microsphères d'huile et stabilise le mélange. Le pouvoir émulsifiant est plus marqué en présence d'électrolytes. Ses propriétés filmogènes en font aussi un bon candidat pour une utilisation en encapsulation comme par exemple pour la fixation d'arômes (Dickinson, 1991).

La gomme arabique est utilisée dans divers secteurs. En cosmétique et pharmaceutique, elle permet principalement la stabilisation des suspensions. Elle sert comme agent de liaison ou de cohésion dans plusieurs technologies (papeterie, textile, imprimerie). En alimentaire, elle reste l'hydrogel végétal le plus utilisé car c'est une fibre alimentaire 100% naturelle sans effet secondaire. De plus, sa faible viscosité et son absence de goût permettent de l'utiliser en grandes quantités sans dénaturer les propriétés organoleptiques du produit (Kravtchenko, 1996). Elle est souvent employée pour prévenir la cristallisation des sucres lors de la confection de bonbons ou de pâtes de fruits et pour assurer une distribution homogène des graisses dans les caramels et toffee (Whistley, 1993).

```
          A                                                          G   G
          |                                                          |   |
      U - G                                                          G - G
          |                                                          |
      G - G                                                      U - G - G
          |                                                          |
  A   G -                                                        A   G - A
  |       |                                                        |   |
          A                                                          U - G
          |                                                          |
→3-β-D-Galp-(1→3)-  β-D-Galp-(1→3)-  β-D-Galp-(1→3)-  β-D-Galp-(1→3)-
β-D-Galp-(1→        |                |                |
                    G                A                G - A
                    |                                 |
                    U                                 U
```

G = β-D-Gal*p*

A = chaînes courtes de L–Ara*f* liées (1→3) ou α-D-Gal*p*-(1→3)-L–Ara*f*

U = α-L-Rha*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*A ou β-D-Glc*p*A(4-OMe)

Figure 1 : Hypothèse structurale de la gomme d'acacia, Gal*p* : galactopyranosyl, Rha*p* : rhamnopyranosyl, Glc*p*A : glucuronopyranosyl, β-D-Glc*p*A(4-OMe) : 4-O-méthyl-β-D-glucuronopyranosyl, Ara*f* : arabinofuranosyl (Stephen *et al.*, 1990)

I.2. LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'ENCAPSULATION

Les techniques d'encapsulation sont très nombreuses. Une simple recherche de brevets sur « méthodes d'encapsulation » donne plus de 100 réponses (esp@cenet). De plus, les classer reste difficile car il n'existe pas de critères permettant une parfaite discrimination. En effet, en fonction de l'information que l'on recherche, il peut être plus intéressant de classer les procédés en fonction de la taille des particules obtenues, de l'emploi ou non de solvant, de la nature du polymère enrobant ou encore de la nature du milieu dispersant.

Les principales techniques d'encapsulation peuvent être regroupées en trois pôles : les techniques physico-chimiques basées sur le mélange, l'émulsion; les techniques d'interactions chimiques, de coacervation et enfin les méthodes de pulvérisation et de formation de gouttelettes basées sur des procédés physiques. Ces trois classes de procédés varient aussi par le type de matériau enrobant utilisé. Les procédés physiques et physico-chimiques font intervenir des polymères préformés alors que les techniques chimiques sont basées sur la formation *in situ* du matériau et donc sur l'utilisation de monomères.

I.2.1. Les techniques d'emulsion

L'émulsion est la dispersion d'un liquide dans un autre liquide sachant que les deux sont insolubles.

Différents types d'émulsion peuvent être réalisés :

✧ **Emulsion huile dans eau** pour encapsuler des molécules peu ou pas hydrosolubles

✧ **Emulsion non aqueuse** permettant d'encapsuler des molécules hydrosolubles en remplaçant la phase externe par un non-solvant de la molécule

✧ **Emulsion multiple eau dans huile dans eau**, le principe actif est bloqué dans le solvant et ne peut pas diffuser vers les phases aqueuses externe ou interne.

La taille des microsphères obtenues par émulsion varie de quelques microns à une dizaine voire une centaine de microns (Poncelet *et al.*, 1993). La méthode d'émulsion a été améliorée grâce aux mélangeurs statiques (Figure 2). L'émulsion est réalisée par le passage des solutions sur des petits éléments entrecroisés qui vont jouer le rôle d'agitateur.

La géométrie de ces mélangeurs est directement corrélée à la taille des gouttelettes obtenues. L'intérêt de cette méthode est qu'elle permet une production en continu (Maa & Hsu, 1996).

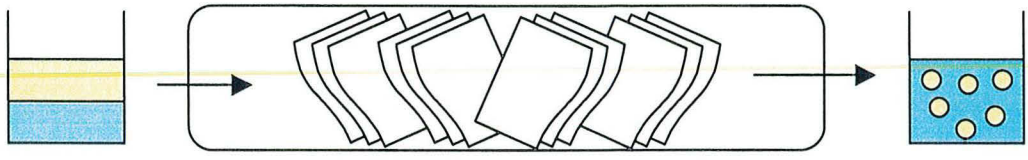


Figure 2 : principe de la réalisation d'une émulsion par passage dans des mélangeurs statiques

A partir du principe de l'émulsion, il est possible de réaliser des encapsulations de différentes façons.

- *LA TECHNIQUE D'EMULSION–EVAPORATION DE SOLVANT*

Une microémulsion est réalisée entre une phase aqueuse et une phase organique contenant un polymère et un principe actif en solution. L'évaporation du solvant entraîne la désolvatation du polymère et donc l'encapsulation du principe actif (Figure 3).

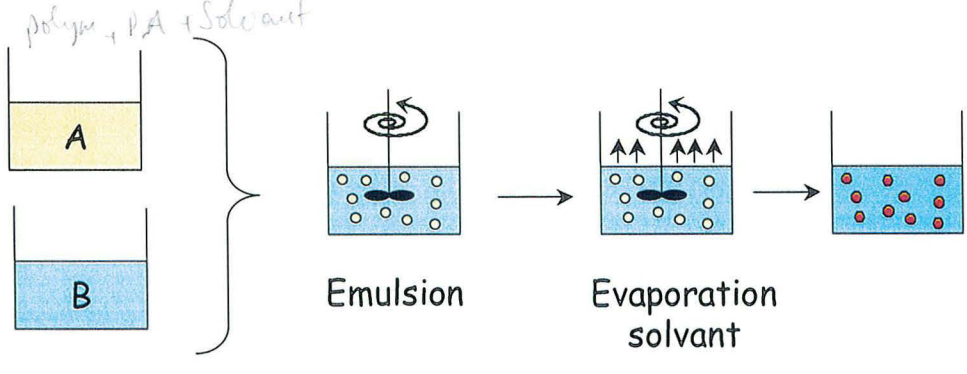


Figure 3 : Principe de la méthode d'émulsion-évaporation de solvant. A : phase organique contenant la matière active en solution, B : phase aqueuse

La technique d'émulsion-évaporation de solvant conduit à la formation de microsphères. La distribution de taille est généralement polydispersée. Elle est fortement dépendante du type d'agitation employée (Poncelet *et al.*, 1993). Les taux d'encapsulation sont de l'ordre de 30 à 40%. Pour faciliter la réalisation de l'émulsion, des émulsifiants et des stabilisants peuvent être ajoutés à la préparation avant l'évaporation du solvant. Le principal inconvénient de cette méthode est la présence de résidus de solvant, qui peuvent nécessiter un deuxième traitement pour être éliminés.

- *LA TECHNIQUE D'EMULSION–GELIFICATION*

Les microsphères sont obtenues par formation d'une émulsion entre un polymère à propriété gélifiante et une phase dispersante (Figure 4). La gélification résulte, comme lors d'une extrusion, soit d'un abaissement de la température, gélification thermique, soit de l'ajout d'ions, gélification ionique.

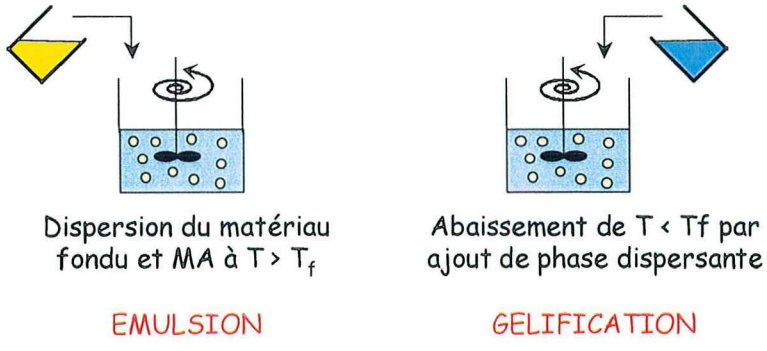


Figure 4 : encapsulation de matière active (MA) par émulsion-gélification thermique, T : température de travail, Tf : température de fusion du matériau fondu.

Les microsphères d'alginate obtenues par extrusion ont difficilement une taille inférieure à 100 µm.

Par contre, lorsqu'elles sont obtenues par émulsion en ajoutant progressivement le chlorure de calcium au mélange alginate de sodium / phase organique, la taille des granules passe en dessous des 100 µm. Toutefois, la méthode d'émulsion–gélification est pertinente pour les faibles concentrations en alginate. A partir d'une concentration en alginate de 4 % (m/m), la trop forte viscosité de la solution diminue l'efficacité du mélange et conduit à la formation de granules irréguliers de forme plus ou moins allongée (Chan *et al.*, 1997).

- *La polymerisation ou polycondensation interfaciale*

Contrairement aux autres méthodes chimiques, la polycondensation interfaciale fait intervenir des monomères et non des polymères pré-formés (Arshady, 1999). Cette méthode fut parmi les premières techniques d'encapsulation mises au point (Chang, 1964). Elle est basée sur la formation *in situ* d'une membrane polymérique suite à la mise en contact de deux monomères, l'un soluble dans le dispersant, l'autre insoluble (Figure 5). La réaction chimique entre les deux monomères se déroule à l'interface entre la phase dispersante et la phase dispersée. L'exemple classique est la réalisation de membrane type nylon. Une solution aqueuse de diamine, contenant la molécule d'intérêt est dispersée dans une phase organique. L'agent réticulant, un chlorure d'acide soluble dans la phase dispersante, est ajouté entraînant la formation d'une membrane polymérique autour des microgouttes (Arshady, 1999).

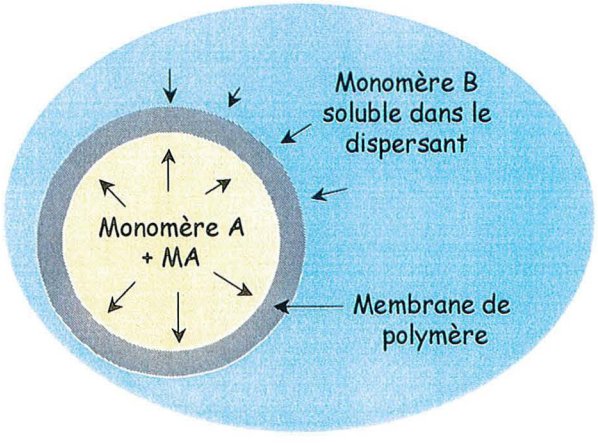


Figure 5 : formation *in situ* de la membrane polymérique par polycondensation interfaciale lorsque la matière active (MA) est soluble dans A

Comme pour les autres méthodes basées sur la réalisation d'une émulsion, la distribution de taille dépend surtout de la vitesse et du type d'agitation utilisé, de la présence de tensioactifs et de la nature des monomères employés. Cette méthode permet de produire des microcapsules. De nombreuses applications se retrouvent dans le domaine phytosanitaire et dans l'encapsulation d'enzymes pour la réalisation de microréacteurs (Chamberlain & Symes, 1993).

I.2.2. Les techniques de coacervation

Le mot coacervation provient du latin *acervus* qui signifie agrégat et du préfixe *co* qui exprime l'association de macromolécules. Lorsqu'une solution colloïdale est soumise à des modifications environnementales (pH, température), les forces d'attraction entre molécules deviennent supérieures aux forces de liaison molécules-solvant entraînant une désolvatation de la solution. Il en résulte l'apparition d'une nouvelle phase constituée de gouttelettes appelée coacervat (Michaels, 1965).

Il existe deux types de coacervation : la coacervation simple et la coacervation complexe.

✧ **La coacervation simple** fait intervenir un seul polymère. Elle est induite par une modification des conditions extérieures comme l'ajout d'ions ou la variation de la température (Burgess, 1994). Elle conduit à la formation de microcapsules ou de microsphères lorsque les coacervats s'agrègent. Les particules ont généralement une taille comprise entre 20 et 200 µm et le taux d'encapsulation est inférieur à 60%. La méthode est surtout utilisée pour encapsuler des molécules liposolubles, mais des molécules hydrosolubles peuvent aussi être encapsulées en utilisant un polymère hydrophobe comme l'éthylcellulose (Arshady, 1999).

✧ **La coacervation complexe** correspond à la désolvatation de deux polyélectrolytes suite à une modification de pH entraînant des interactions électrostatiques entre les molécules (Figure 6). Cette méthode est surtout utilisée pour l'encapsulation de matières actives liposolubles. Toutefois, il est possible de l'adapter à l'encapsulation de composés solubles en réalisant une émulsion multiple au préalable (Chamberlain & Symes, 1993). Le couple gélatine / gomme acacia est un duo classique utilisé en coacervation. Ses applications se sont surtout développées en industrie pharmaceutique pour contrôler la libération de différentes drogues et pour l'encapsulation d'huiles essentielles (Palmieri *et al.*, 1996).

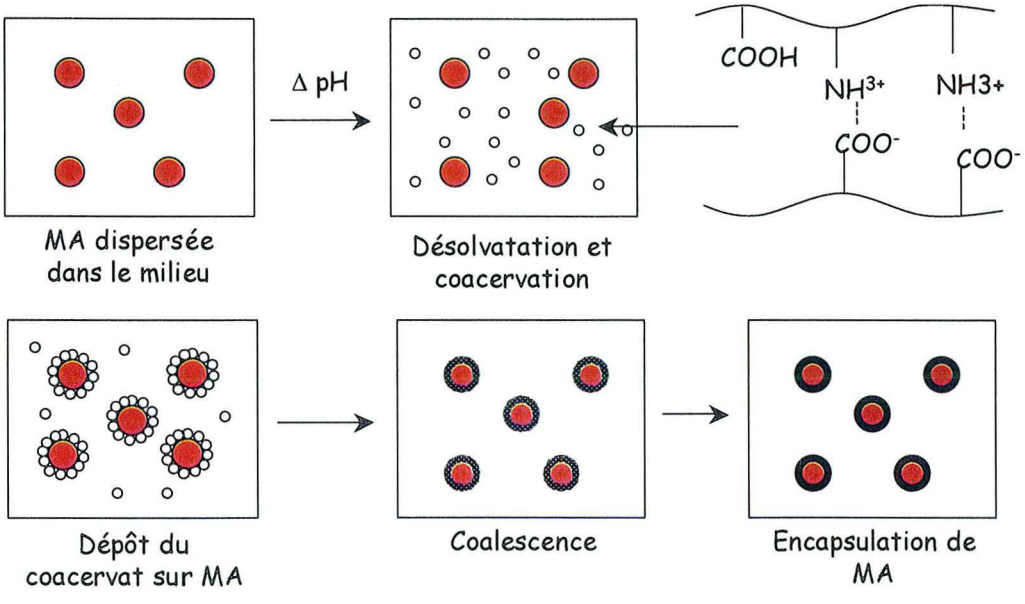


Figure 6 : encapsulation de matière active (MA) liposoluble par coacervation complexe (Amiet-Charpentier *et al.*, 1998)

L'efficacité de la coacervation en tant que méthode d'encapsulation dépend de nombreux facteurs, et principalement de la mouillabilité du coacervat sur la matière active. Si le coacervat ne mouille pas suffisamment la molécule à encapsuler, il n'y aura que des encapsulations partielles voire aucune encapsulation (Thomasin *et al.*, 1997).

I.2.3. Les techniques d'extrusion

Cette technique permet la formation de gouttelettes par extrusion d'une solution à travers un tube ou une aiguille. L'extrusion peut être réalisée de différentes façons : simplement par gravité, par ajout d'un flux coaxial ou sous l'action d'un potentiel électrostatique (Figure 7). L'extrusion par gravité est la méthode la plus simple mais elle ne permet pas la formation de gouttes de taille inférieure à 1 mm et cela quel que soit le type de seringue utilisé. Les deux autres techniques font intervenir une force extérieure, soit un flux d'air ou de liquide soit une différence de potentiel électrostatique, qui facilite la rupture du jet. Ces adaptations de la méthode initiale permettent d'obtenir des billes d'une taille inférieure à 500 µm (Poncelet *et al.*, 1993).

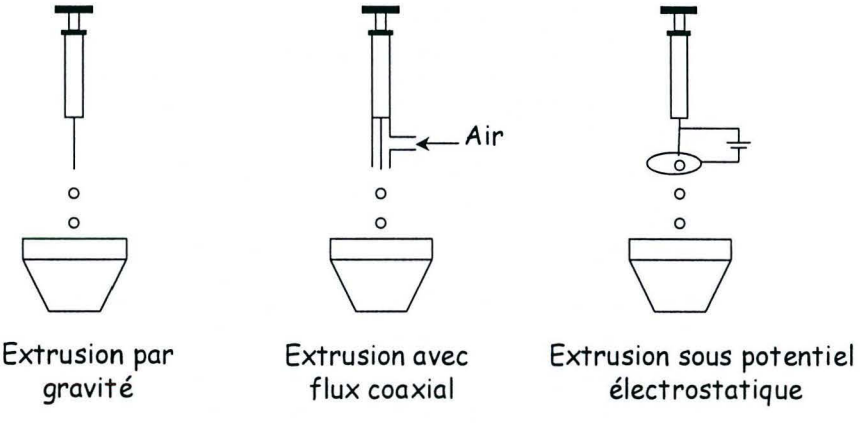


Figure 7 : schéma des trois principales techniques d'extrusion

La formation de la capsule peut être obtenue de différentes façons soit par gélification thermique ou ionique, soit par chélation ou encore par formation de liaisons covalentes. La technique de rupture de jet est aussi basée sur la formation de gouttelettes à partir d'un liquide extrudé. A la différence des méthodes d'extrusion classiques, les gouttelettes ne se forment pas à la sortie de la seringue, car le liquide est sous pression, mais suite au passage de couteaux qui vont rompre le jet (Figure 8).

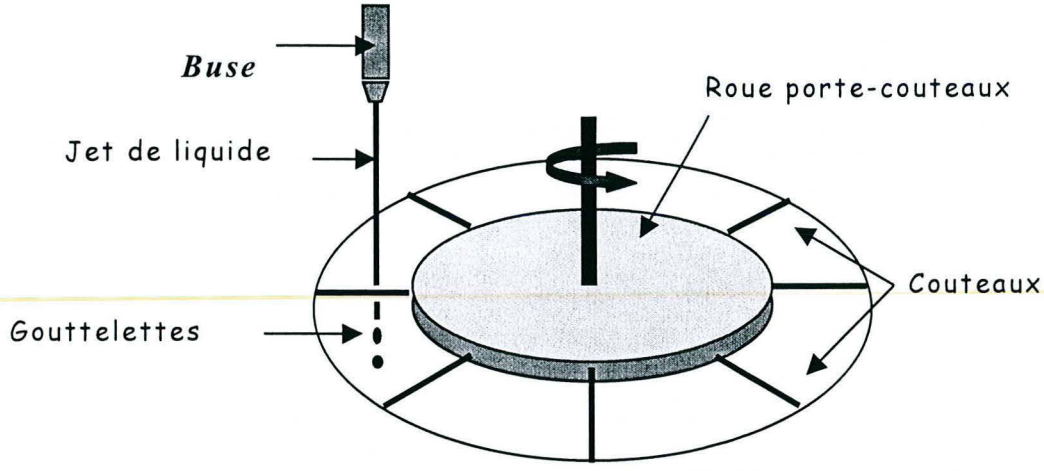


Figure 8 : Principe de la méthode de rupture de jet

Par cette méthode il est possible d'obtenir des particules dont la taille varie de 100 µm à 3 mm. La distribution taille est monodispersée. La méthode est applicable à des liquides de plus ou moins forte densité contrairement aux méthodes d'extrusion classiques (Prüße &Vorlop, 1999). Par la suite, la technique de rupture de jet a été améliorée de façon à réduire les pertes dues au passage des couteaux et à augmenter les taux de production en multipliant le nombre de buses (Figure 9).

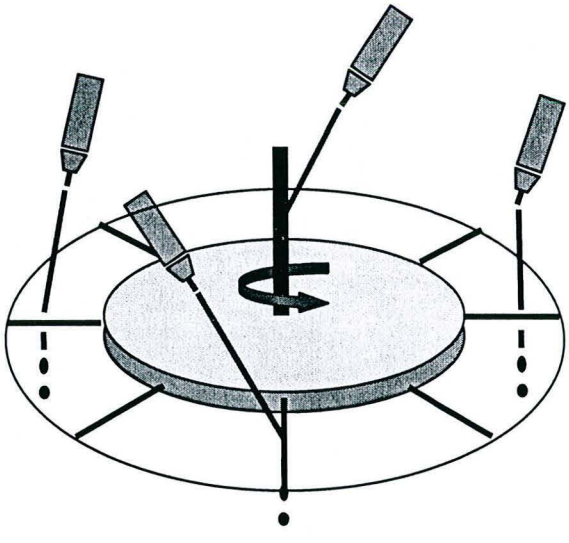


Figure 9 : adaptation de la méthode de rupture de jet (Vorlop & Prüße, 2001)

I.2.4. Les techniques de spray

Le principe général repose sur la pulvérisation d'un liquide dans un milieu environnant chaud ou froid. Ainsi, les gouttelettes formées se solidifient lors de leur chute dans une atmosphère stable ou dans un flux d'air à co ou contre courant du flux de pulvérisation. Il existe plusieurs méthodes basées sur ce principe : le « spray cooling », le « spray drying » ou atomisation et le « spray coating » ou pelliculage en lit d'air fluidisé. Toutefois, cette dernière technique est à isoler de deux précédentes car ce n'est pas à proprement dit une méthode de production de microparticules.

– - *Le « spray cooling »*

Le « spray cooling » est une adaptation industrielle de la méthode de gélification thermique. En effet, la matière active est dissoute dans un composé en fusion, qui est souvent une cire. La solution est ensuite pulvérisée dans une chambre d'atomisation où la température est inférieure à la température de fusion du polymère. Le changement de température entraîne la solidification immédiate du matériau et donc l'encapsulation de la matière active. La méthode peut être améliorée en incluant des systèmes de recyclage qui réinjectent les particules trop grosses et trop petites dans la solution de pulvérisation (Marcussen & Markussen, 1993). Par cette technique, il est possible d'obtenir une distribution de taille relativement homogène. L'intérêt de ce procédé est son faible coût de fonctionnement après l'acquisition de la tour de pulvérisation. Il est surtout utilisé dans les industries produisant des fertilisants comme le nitrate d'ammonium (Roberts & Shah, 1975) et dans le domaine des détergents (Marcussen & Markussen, 1993).

- *Le « Spray-drying » ou atomisation*

L'atomisation est une technique de séchage de particules en solution ou dispersion. Elle implique une phase d'évaporation du diluant réalisée grâce à un flux d'air chaud (Figure 10).

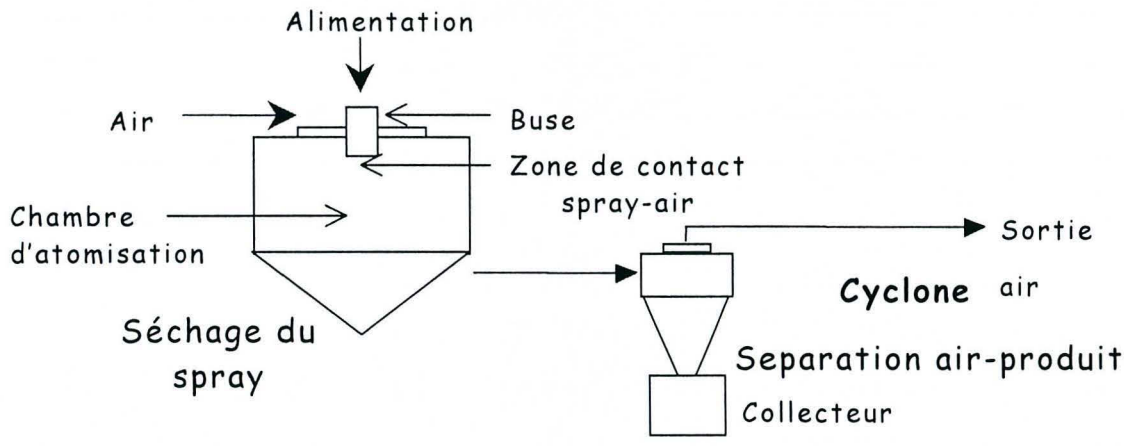


Figure 10 : principe d'un atomiseur

Le séchage par atomisation se déroule en quatre étapes :

- ✧ **la transformation** de la solution d'alimentation en spray dans la buse
- ✧ **le mélange** du spray à l'air ambiant au niveau de la buse
- ✧ **le séchage** du spray dans la chambre d'atomisation
- ✧ **la séparation** du produit et de l'air dans le cyclone.

La technique d'atomisation repose sur la théorie de formation d'un spray de Taylor. La densité du gaz ambiant à un effet sur la rupture du jet de pulvérisation. Lorsque l'air a une force d'inertie suffisante, il génère des gouttelettes d'un diamètre inférieur à celui du jet.

Les propriétés d'un spray reposent sur de nombreux paramètres tels que les effets de cavitation du flux dans la buse, la vitesse du jet, la turbulence à la sortie de la buse et les propriétés thermodynamiques et physiques du gaz et du liquide. La conformation interne de la buse est déterminante dans la rupture du jet car elle définit l'éloignement du lieu de rupture du jet par rapport à la sortie de la buse (Figure 11). La qualité du séchage reposant sur des transferts de chaleur et de matière, dépend principalement de la température, de l'humidité et des capacités de transport de l'air ambiant.

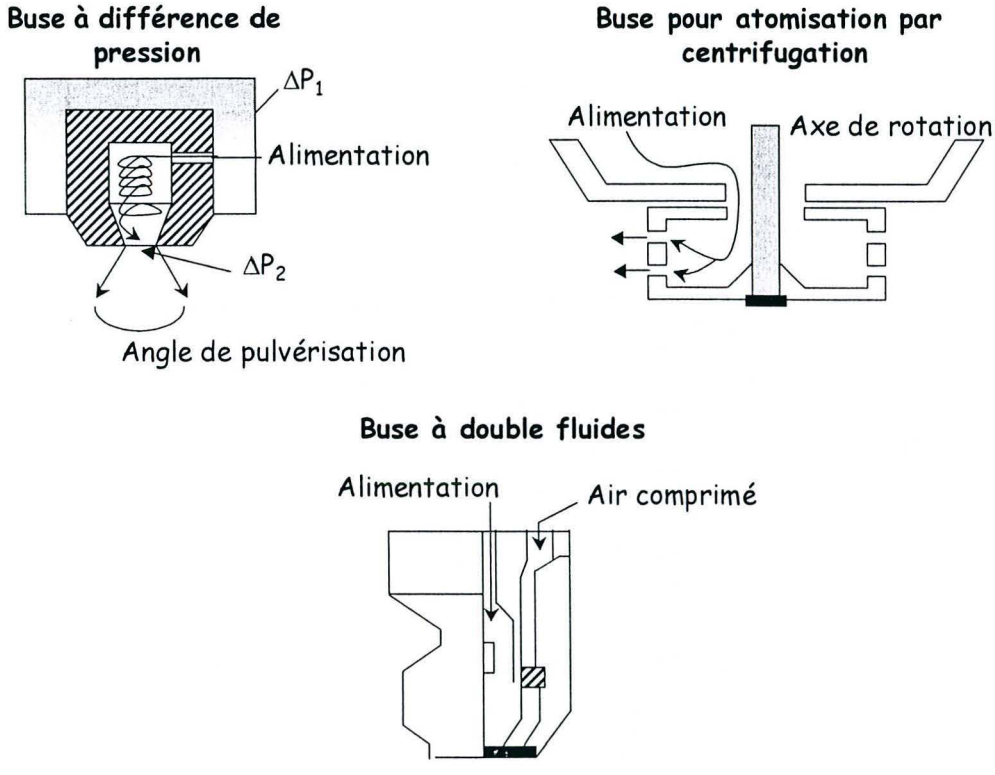


Figure 11 : principaux types de buses utilisées en atomisation

Lorsque les différents paramètres de l'atomisation sont contrôlés, il est possible de déterminer la taille des particules obtenues. Diverses études ont montré que lorsque la viscosité, la concentration ou le débit d'alimentation de la solution de pulvérisation augmentent, la taille des particules obtenues s'accroît.

Les effets de la température semblent plus limités et dépendent surtout des propriétés intrinsèques de la solution. Par exemple, lorsqu'un matériau cristallin est atomisé, le diamètre moyen des particules diminue significativement lorsque la température d'entrée de l'air augmente. Enfin, la tension de surface apparaît être sans conséquence sur la distribution de taille (Nath & Satpathy, 1998). Le phénomène d'évaporation au niveau de la gouttelette est très rapide par conséquent, sa température interne reste peu élevée. C'est pourquoi certaines molécules thermiquement sensibles telles que des enzymes peuvent être atomisées. De plus, la durée du séchage reste très courte comparée à d'autres procédés.

Les principales applications industrielles de cette méthode sont en alimentaire : le café instantané, le lait en poudre, les soupes déshydratées. Dans d'autres domaines, l'atomisation est utilisée pour stabiliser des enzymes utilisées dans des détergents tel que les lessives, des pigments pour les peintures ou les cartouches d'encre, des antibiotiques et des constituants de base de rouges à lèvres (Nath & Satpathy, 1998).

– - *LE « SPRAY-COATING » OU PELLICULAGE EN LIT D'AIR FLUIDISE*

Le pelliculage en lit fluidisé est utilisé depuis les années 50 dans l'industrie pharmaceutique. C'est une technique dérivée du principe général car elle correspond à un enrobage et non à une production de particules. Un film polymérique est pulvérisé sur des particules en mouvement dans un courant d'air chaud. L'objectif est d'obtenir un enrobage homogène des particules après plusieurs passages dans la zone de pulvérisation.

Par cette technique, il est possible de traiter des particules dont la taille varie d'une centaine de microns à plusieurs millimètres. L'alimentation en polymère peut être de plusieurs types.

✧ **Le « Top-spray »** est une pulvérisation à contre courant (Figure 12). La pulvérisation se fait à l'extrémité supérieure de la colonne, donc à la surface du lit de particules, ce qui entraîne un risque important de séchage. Les mouvements de fluidisation sont trop aléatoires c'est pourquoi les particules n'ont pas un pelliculage homogène (Magnet, 1997).

✧

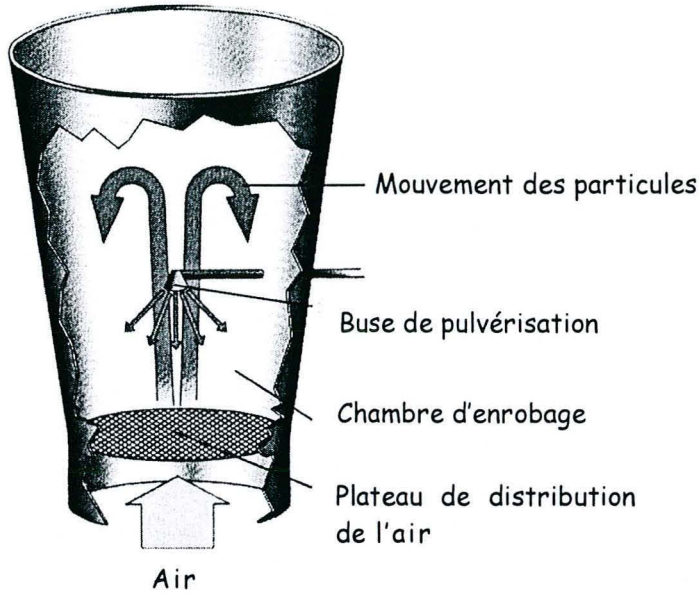


Figure 12 : pulvérisation en « top spray »

✧ **Le « Tangential-spray »** est un système de type rotor. L'alimentation se fait tangentiellement au courant d'air directement à l'intérieur du lit (Figure 13). Le pelliculage obtenu est homogène et continu mais les fortes contraintes mécaniques ne permettent pas d'utiliser cette technique avec des matériaux fragiles ou friables (Magnet, 1997).

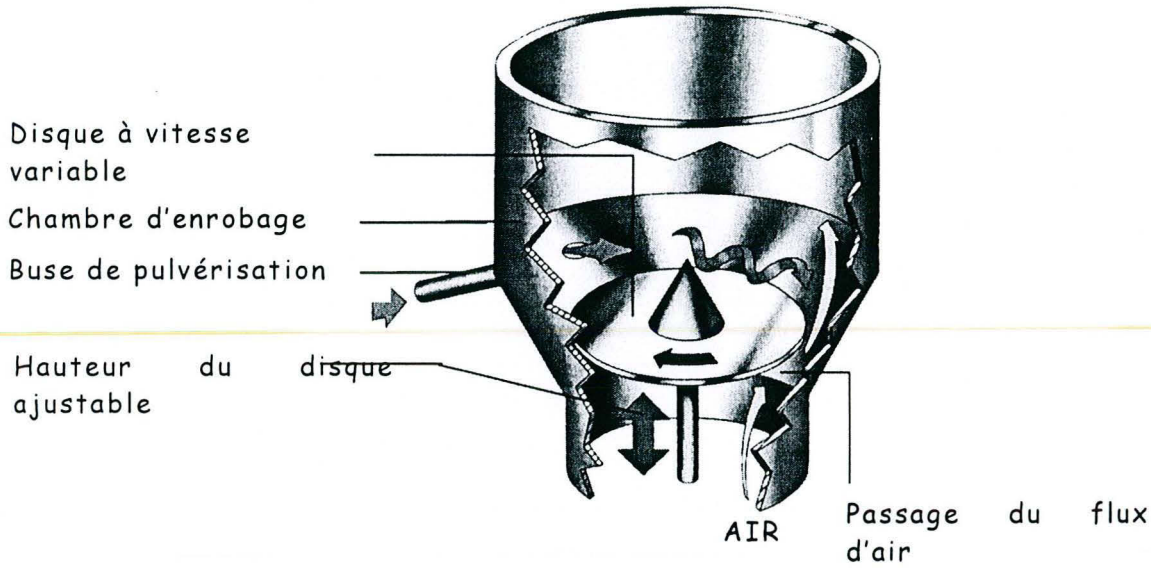


Figure 13 : pulvérisation en « tangential spray »

✧ **Dans le système « Bottom-spray »**, la solution d'enrobage est projetée en co-courant, à la base de la colonne directement dans le lit de particules. En 1953, Dale Wurster améliore ce principe général en ajoutant un cylindre central dans la chambre de pulvérisation et un courant gazeux auxiliaire (Figure 14). La présence du cylindre permet la création d'une zone où les particules en chute libre sont séchées par le courant d'air chaud ascendant (Shelukar *et al.*, 2000).

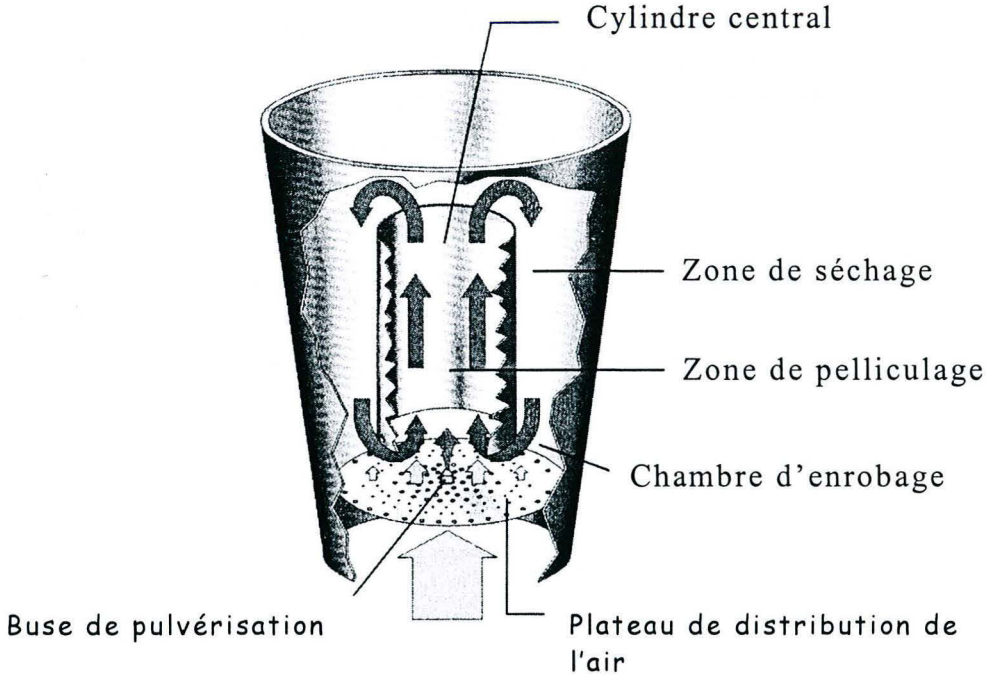


Figure 14 : schéma du procédé Wurster

La formulation choisie et la méthode d'encapsulation employée vont conjointement influencer les caractéristiques physico-chimiques de la particule obtenue.

II. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES MICROPARTICULES

Les microparticules obtenues par microencapsulation ont des propriétés physico-chimiques totalement dépendantes de la méthode et de la formulation employées. Pour caractériser une particule, quatre critères sont classiquement utilisés : la structure de la microparticule, sa taille, le taux d'encapsulation et le type d'interaction avec l'environnement.

II.1. LA STRUCTURE

Il existe de nombreux types de structures dont les plus simples sont le système réservoir et le système matriciel (Figure 15).

Figure 15 : principaux systèmes d'encapsulation

Pour les microparticules du type réservoir, le composé d'intérêt est contenu dans un cœur liquide ou semi-liquide. Il est isolé de l'environnement par une membrane polymérique (Figure 15a). Ce type de structure conduit à la production de microcapsules.

Dans les systèmes matriciels, le composé est dispersé sous forme de gouttelettes ou de particules dans une matrice polymèrique (Figure 15b).
Ils permettent la production de microsphères ou microbilles. Le composé et le polymère sont associés.

Chacun de ces systèmes a des avantages et des inconvénients repris dans le tableau suivant (Tableau 2).

	Système réservoirs	*Système matriciel*
Fragilité	oui	non
Rapport composé/polymère	50 à 95 %	< 30 %
Cinétique de libération	constante au cours du temps	diminue au cours du temps
Considérations économiques	procédés complexes souvent coûteux	procédés simples et peu coûteux

Tableau 2 : avantages et inconvénients des systèmes réservoir et matriciel (Couarraze & Porte, 1993)

Toutefois, il est important de noter que dans la pratique, ces structures ne sont pas les seules à exister. Tous les états intermédiaires peuvent se rencontrer comme les systèmes polynucléés ou les capsules de microcapsules (Arshady, 1993).

II.2. La taille

La taille est un facteur discriminant. Généralement, lorsque l'on parle de microparticules, ce terme implique une taille moyenne comprise entre 1 et 1000 µm. Au-delà de cette gamme, on parlera de microgranules et en deçà de nanoparticules (Arshady, 1999).

La taille des particules est directement corrélée à la méthode d'encapsulation employée (Figure 16). Mais le choix d'une taille a un impact financier important. En effet, plus une particule est petite, plus la surface totale d'un même volume de particules sera importante. Par conséquent, la quantité de matériau utilisée sera plus grande et la durée du procédé plus longue. C'est pourquoi dans la plupart des secteurs utilisant l'encapsulation, les particules ont généralement des tailles comprises entre 200 et 800 µm de façon à trouver le meilleur compromis entre coûts et profits (Eichler, 2001).

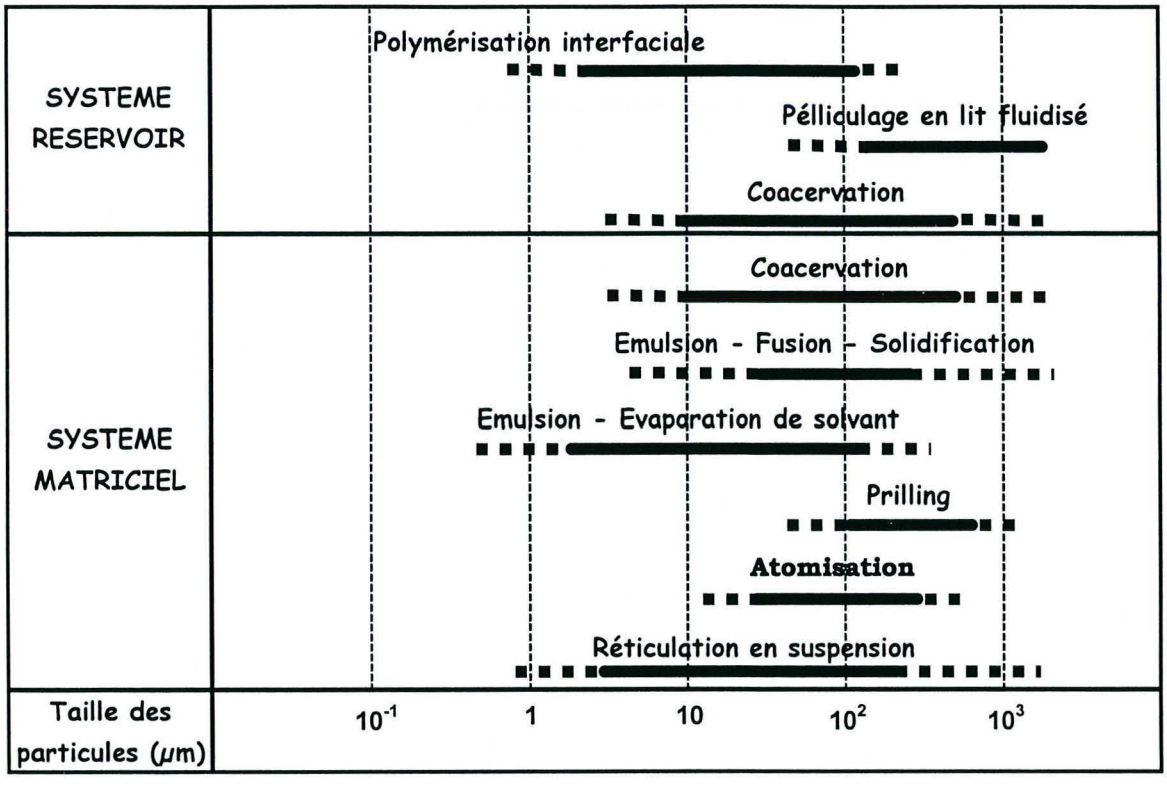


Figure 16 : taille des particules obtenues en fonction de la technique d'encapsulation (Couarraze & Porte, 1993)

▬▬▬ domaine de tailles préférentielles
▪▪▪▪▪▪ domaine de tailles accessibles avec adaptation de la méthode

La distribution de taille est généralement polydispersée. Les méthodes de goutte à goutte sont les seules à offrir une distribution quasi monodispersée. La taille et la monodispersité sont toutefois liées au type de procédé d'extrusion employé (Arshady, 1999).

II.3. Le taux d'encapsulation

Le taux d'encapsulation est habituellement compris entre 85 et 98% pour les systèmes réservoirs et entre 20 et 35% pour les systèmes matriciels.

Ces taux peuvent devenir beaucoup plus faibles principalement dans les structures complexes telles que les liposomes multilamellaires. Ils présentent en effet une structure dite en « peau d'oignon » composée de nombreuses membranes qui limitent l'espace intermembranaire et donc les possibilités d'encapsulation (Arshady, 1999).

De même pour les systèmes réservoir, le taux d'encapsulation est fortement dépendant du rapport cœur/membrane. Par exemple, lors de l'encapsulation de théophylline par des protéines du petit-lait, le taux d'encapsulation passe de 16 à 85% pour des rapports cœur/membrane variant de 1:1,5 à 5:1,5 (Lee & Rosenberg, 2000).

II.4. Les interactions avec l'environnement

Le dernier paramètre caractérisant les propriétés d'une microparticule est le type d'interaction avec le milieu extérieur. Il existe deux principes d'interaction.

✧ La matière active doit être maintenue dans la microparticule, on parle alors de microréacteur.

✧ la matière active est libérée de la microparticule soit brutalement : libération déclenchée, soit progressivement : libération prolongée (Figure 17).

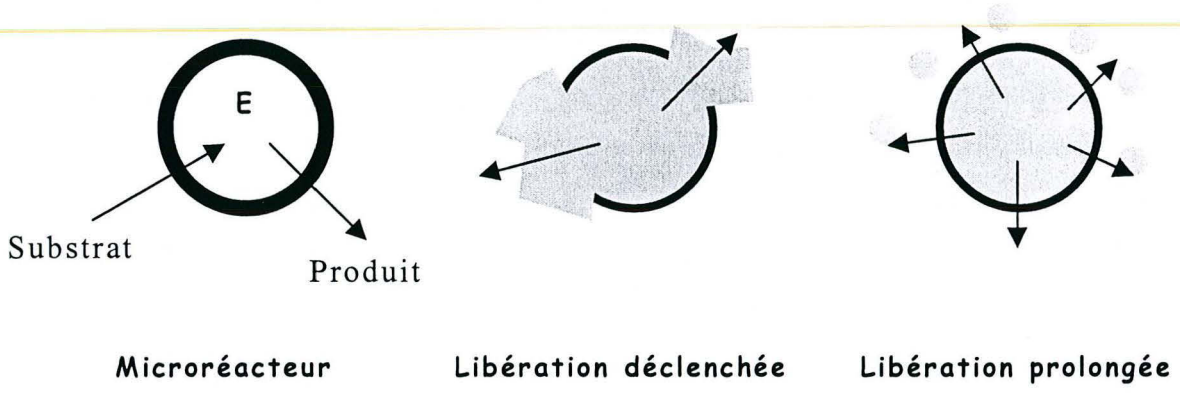


Figure 17 : principaux types d'interactions microparticule/environnement

Les systèmes microréacteurs se retrouvent principalement lors de l'encapsulation d'enzymes ou de cellules. La membrane doit être semi-perméable afin de retenir les grosses molécules et les enzymes et laisser diffuser les petites molécules de substrat ou de produit (Parthasarathy & Martin, 1994). Le nylon et la cellulose sont souvent utilisés pour réaliser ce type de particules. La connaissance des mécanismes de diffusion de ces petites molécules est nécessaire pour éviter, par exemple, l'accumulation rapide de produit dans la capsule, ce qui risquerait de faire exploser la membrane (Bickerstaff, 1997).

Les systèmes à libération déclenchée sont constitués d'une membrane imperméable qui va se casser suite à l'application d'une pression osmotique ou mécanique ou encore d'une modification de pH ou de température. La dégradation de la membrane entraîne une libération brutale de la matière active dans le milieu extérieur. L'un des plus beaux exemples d'utilisation de ce système est le papier sans carbone commercialisé en 1954 par la société National Cash Register Compagny (NCR, Ohio).

Le principe est basé sur la libération brutale de l'encre suite à la pression exercée par le stylo (Arshady, 1999).

Un autre exemple d'utilisation de ce type de capsules est le système « scratch'n'sniff » littéralement « grattez et sentez ». Des molécules de parfum sont encapsulées et insérées entre deux feuilles de papier légèrement adhésives ou sur une seule feuille. La rupture des capsules est déclenchée par le retrait rapide de la feuille située à la surface ou lorsque la zone traitée est grattée. Cette application a eu un énorme succès commercial. Elle se retrouve aujourd'hui dans de nombreux journaux et magazines ou sur des autocollants pour enfants (Turner & Levey, 1993).

Pour les systèmes à libération prolongée, les polymères peuvent être éliminés par hydrolyse, par dégradation enzymatique ou par une quelconque modification de l'environnement (pH, température, humidité). Ces techniques de libération contrôlée sont surtout utilisées en pharmacie et cosmétique.

La cinétique de libération peut être d'ordre 0 ou 1. Elle dépendra principalement de l'épaisseur de la membrane, sa porosité, sa composition chimique et bien sûr des propriétés de la matière active (Greenblatt *et al.*, 1993).

Lorsque la formulation et le procédé ont été envisagés, la suite de la mise au point de la procédure d'encapsulation repose sur l'étude des propriétés du système à encapsuler. La seconde partie de la revue sera donc consacrée au système lactoperoxydase / thiocyanate / peroxyde d'hydrogène, système modèle de notre étude.

III. LE SYSTEME LACTOPEROXYDASE / THIOCYANATE / PEROXYDE D'HYDROGENE OU SYSTEME LP (LPS)

Le système lactoperoxydase / thiocyanate / peroxyde d'hydrogène est un système enzymatique antimicrobien naturellement présent dans le lait.

La mise en évidence du lien existant entre la présence de peroxydase et d'oxydase dans le lait cru et l'activité bactéricide observée remonte aux années 30 (Hanssen, 1924). Mais ce n'est que dans les années 60 que le rôle inhibiteur de la lactoperoxydase fut démontré, par ajout d'enzyme purifiée à du lait chauffé (Portmann & Auclair, 1959). Depuis, les études de caractérisation se sont multipliées. La lactoperoxydase se retrouve dans les principales sécrétions des mammifères comme les larmes, la salive ou le lait. Associée au thiocyanate et au peroxyde d'hydrogène, elle forme le système lactoperoxydasique ou système LP (Reiter, 1978). Ce système permet la transformation du thiocyanate (SCN^-) en hypothiocyanite ($OSCN^-$) en présence d'H_2O_2 selon la réaction globale suivante :

$$SCN^- + H_2O_2 \xrightarrow{\textit{LPO}} OSCN^- + H_2O$$

L'hypothiocyanite a été rapidement identifié en tant que produit d'oxydation majoritaire de la réaction. Les étapes et les produits d'oxydation intermédiaires ont été mis en évidence par la suite (Aune & Thomas, 1977).

Ultérieurement, des études menées sur *Streptococcus mutans* ont permis d'identifier $OSCN^-$ comme l'agent antibactérien du système (Hoogendoorn *et al.*, 1977).

Depuis, le spectre d'action du système est largement étudié. L'effet antibactérien du système LP a été testé sur de nombreuses souches bactériennes, d'altération ou pathogènes, présentant un intérêt alimentaire telles que *Pseudomonas fluorescens, Escherichia coli* (Björck *et al.*, 1975), *Bacillus cereus* (Zajack *et al.*, 1981), *Listeria monocytogenes* (Siragusa & johnson, 1989, Denis & Ramet, 1989), *Salmonella Typhimurium* (Reiter *et al.*, 1976), ou *Yersinia enterocolitica* (Farrag *et al.*, 1992).

Plusieurs études ont aussi été réalisées sur les agents responsables des caries comme *Streptococcus agalactiae* (Mickelson, 1979) ou *Porphyromonas* gingivalis (Fadel & Courtois, 2001). Des travaux plus récents ont mis en évidence l'activité fongicide du système (Popper & Knorr, 1997 ; Jacob *et al.*, 2000).

Suite à ces différentes études, l'effet antibactérien du LPS a été résumé à 4 réponses en fonction du type bactérien étudié (Reiter & Härnulv, 1984 ; Kussendrager & Van Hooijdonk, 2000).

✧ **Sur les bactéries Gram-négative, catalase positive ou négative** (*Salomonella*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Yersinia*), l'action du système peut provoquer une bactéricidie sous des conditions de pH, de température et de population initiale déterminées.

✧ **Sur les bactéries Gram-positive, catalase négative** (*Streptococcus*, *Lactobacillus*), l'effet du système est le plus souvent bactériostatique. Mais elles ont la particularité de s'autoinhiber dans le lait en conditions aérobies, suite à la production de peroxyde d'hydrogène.

✧ **Les bactéries Gram-positive, catalase positive** (*Listeria, Staphylococcus*), l'effet du système se manifeste par un arrêt de la croissance (bactériostase) sur des temps variables selon la sensibilité de la souche.

✧ **Les bactéries sporulées** sont à mettre dans une quatrième catégorie. En effet, le système LP agit contre les cellules végétatives selon le classement précédent mais, il reste inactif contre les spores. Dans la spore, la membrane plasmique de la cellule est protégée par plusieurs enveloppes. L'hypothiocyanite doit donc réagir avec les groupements thiols libres présents à la surface avant de pouvoir pénétrer la spore et interférer avec son métabolisme (Zajack *et al.*, 1981).

Parallèlement, des études réalisées *in vitro* ont montré que le système lactoperoxydasique possédait des activités anti-tumorale et anti-virale et qu'il pouvait jouer un rôle de protection des cellules contre l'action de H_2O_2 (Van Hooijdonk *et al.*, 2000).

III.1. La lactoperoxydase (LPO, EC : 1.11.1.7)

Les peroxydases sont présentes chez les bactéries, les moisissures, les plantes et les animaux. Elles peuvent être classées selon des critères structuraux. Les principales peroxydases sont la myéloperoxydase (MPO), la peroxydase eosinophile (EPO), la lactoperoxydase (LPO), la peroxydase thyroidienne (TPO) et la prostaglandine H synthase (PGHS).

Les peroxydases sont des enzymes à noyau hème qui utilisent le peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'électron pour catalyser des réactions d'oxydation (O'Brien, 2000).

III.1.1. Caracteristiques physico-chimiques

La lactoperoxydase est, après la xanthine oxydase, l'oxydase la plus importante du lait de vache. C'est une glycoprotéine cationique formée d'une chaîne polypeptidique de 612 acides aminés, de 78,5 kDa, comportant 10 % de groupements carboxyles. Son point isoélectrique est égal à 9 (Marcozzi *et al.*, 1998). Environ 12% de sa structure est non organisée, 23 % organisée en hélices α et 65 % en hélices β (Figure 18).

Le groupement hème représente le centre catalytique de la molécule. Un ion Ca^{2+} est lié à la molécule et semble avoir une importance dans la stabilité de la conformation de l'enzyme. Le résidu histidine présent en H2 sert de lien avec l'atome de fer du noyau et participe au transfert d'électrons lors des réactions avec SCN^- et I^- (DeWit & Van Hooydong, 1996). L'activité lactoperoxydasique est optimale entre pH 5,1 et 6,5 (Hernandez *et al.*, 1990).

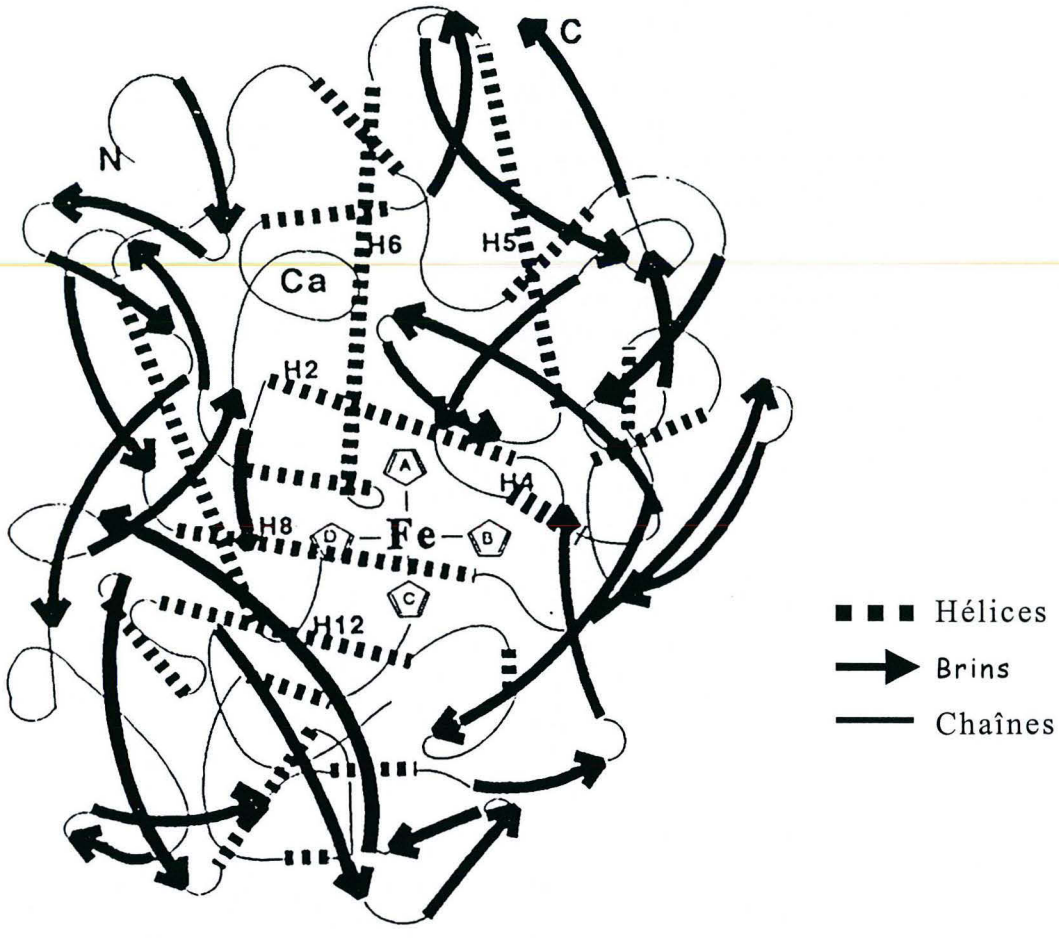


Figure 18 : représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la lactoperoxydase obtenue par extrapolation de la structure d'une myéloperoxydase (DeWit & Van Hooydong, 1996)

III.1.2. STABILITE

La lactoperoxydase est une enzyme thermostable. Sa dénaturation thermique débute à 70°C. Dans les conditions de pasteurisation (72°C-15sec), l'enzyme affiche une activité résiduelle d'environ 70%. Alors qu'elle est totalement désactivée après un traitement 80°C-15sec (Barrett *et al.*, 1999). Sa thermostabilité est plus faible dans du tampon ou dans du perméat de lait que dans du petit lait ou du lait.

Ce résultat est probablement lié à la présence de calcium qui stabilise la structure de l'enzyme (Kussendrager & Van Hooijdonk, 2000). L'enzyme conserve une activité sur une gamme de pH compris entre 4 et 9. Elle est complètement dénaturée à pH 2.6. Cette dénaturation peut être réversible pour des temps d'exposition courts. Chauffée, elle est moins stable en conditions acides, surtout à faible concentration suite au relargage de l'ion calcium (Sato *et al.*, 1992). Elle a une bonne résistance aux enzymes protéolytiques (Kussendrager & Van Hooijdonk, 2000).

La lactoperoxydase peut aussi être dénaturée par le peroxyde d'hydrogène. En effet, la peroxydation de H_2O_2 par la LPO peut conduire à 3 résultats différents.

✧ En présence de suffisamment d'halogénure ou de thiocyanate comme donneur de 2 électrons au composé 1, la LPO est activée de façon optimale.

✧ S'il n'y a pas suffisamment de donneurs, seulement un électron est transféré. Il y a alors accumulation du composé 2 et inactivation réversible de la LPO.

✧ Si enfin, la réaction se passe en excès d'H_2O_2, le composé 3 est formé. Cela conduit à une inactivation irréversible de l'enzyme (DeWit & Van Hooijdonk, 1996).

Cette inactivation de l'enzyme serait le résultat de la transformation du composé 3 en enzyme native via une forme ferreuse (Fe2+) générant un radical ·OH. Ce dernier réagirait avec l'enzyme et entraînerait le clivage du cycle porphyrique, la libération de l'ion Fe3+ et par la même l'inactivation de la LPO (Figure 19).

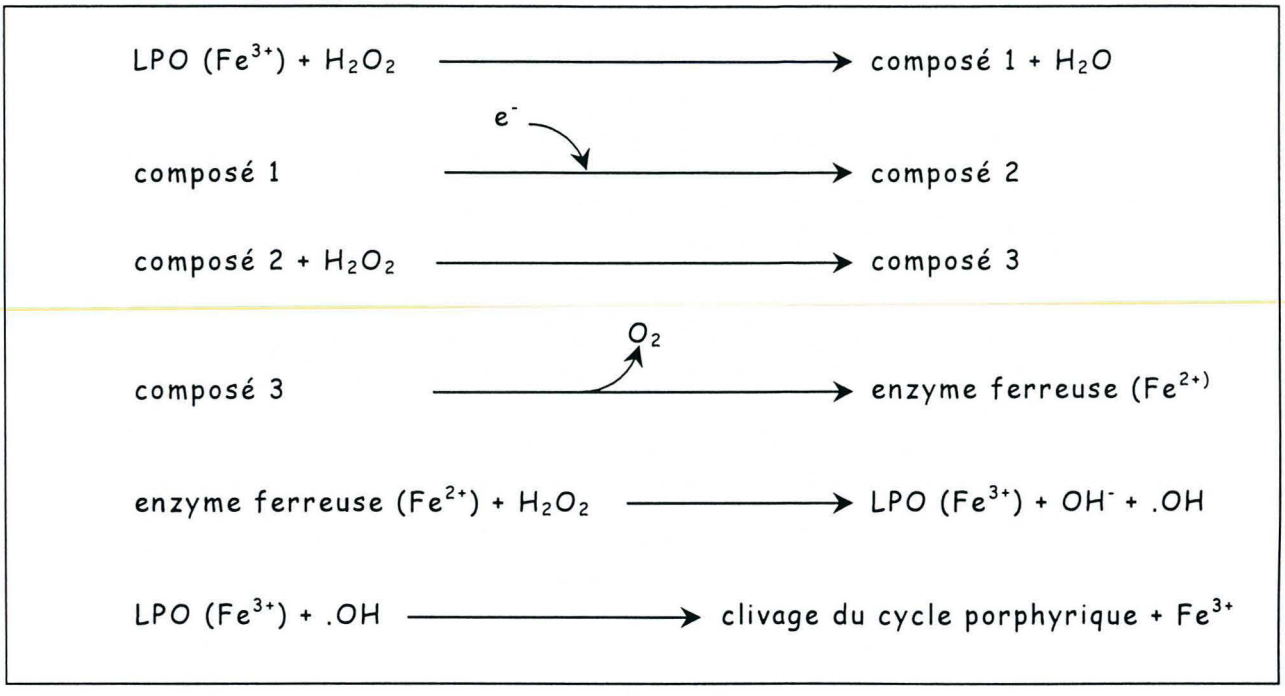


Figure 19 : réactions d'inactivation de la lactoperoxydase (LPO) en présence d'un excès de peroxyde d'hydrogène (Kohler & Jenzer, 1989)

Il est possible de stabiliser l'activité enzymatique de la lactoperoxydase en ajoutant des surfactants ioniques. Ils réagissent avec les protéines par des interactions hydrophobes et ioniques ou par formation de liaisons hydrogène. Généralement, les surfactants cationiques sont plus bactéricides que les anioniques car ils se fixent sur les charges négatives présentes à la surface des bactéries. Différents types de surfactants ont été testés comme par exemple : le sodium-dodecyl-sulfate (SDS, anionique), le chlorure de benzalkonium (Bz, cationique) ou encore le Triton X100 (non ionique). Le triton n'affecte pas l'activité de la LPO, le SDS la diminue d'environ 30% et l'ajout de Bz en faible concentration (0,3 mM) entraîne une augmentation de 10% de l'activité lactoperoxydasique. Il semblerait que les charges positives favorisent l'activité de l'enzyme (Marcozzi *et al.*, 1998). En effet, ces mêmes tests réalisés avec du sulfate d'ammonium conduisent à des résultats similaires à ceux obtenus avec le chlorure de benzalkonium. En conclusion, la charge et la concentration du surfactant influencent l'activité catalytique de la lactoperoxydase (Marcozzi *et al.*, 1998).

III.2. Le thiocyanate

Comme la lactoperoxydase, le thiocyanate est naturellement présent dans les tissus et les sécrétions des mammifères (lait, salive, sécrétion thyroïdienne). Dans le lait, les concentrations en thiocyanate varient selon le type d'animal, son alimentation et la période de lactation (Tableau 3 et Tableau 4). Les deux sources majeures de thiocyanate sont les glucosinolates et les glucosides cyanogéniques. Les plantes du genre *Brassica* (famille des crucifères) tel que le choux, les céréales comme le maïs ou encore les pommes de terre en sont particulièrement riches (Wolfson & Sumner, 1993).

Espèces	*LPO (U/ml)*	*SCN^- (ppm)*
Chèvre	1,55	4,5
Vache	1,4	1 – 10
Bufflonne	0,9	2,6 – 6
Brebis	0,77	10,3
Cochon d'Inde	22	-
Femme	0,06	-

Tableau 3 : Influence de l'espèce animale sur les quantités de lactoperoxydase et de thiocyanate présentes dans le lait (Zapico *et al.*, 1991).

Des essais ont été réalisés pour augmenter la teneur en thiocyanate du lait de vache en enrichissant leur alimentation en végétaux riches en précurseurs de SCN^-. Malheureusement, l'excès de thiocyanate est éliminé dans les urines. Il apparaît donc que le taux de SCN^- dans les sécrétions est dépendant de l'alimentation mais aussi des capacités d'élimination de l'animal qui vont contrôler ce taux (Bibi & Bachmann, 1997).

Temps après la naissance	*LPO (U/ml)*	*SCN^- (ppm)*
0 à 24 h	0,5	5,62
15 jours	1,24	8,09
75 jours	1,91	2,5
150 jours	1,67	1,93

Tableau 4 : Influence de la période de lactation sur les quantités de lactoperoxydase et de thiocyanate présentes dans le lait de chèvre (Zapico *et al.*,1990).

III.3. LE PEROXYDE D'HYDROGENE

En conditions naturelles, le peroxyde d'hydrogène est difficilement détectable dans le lait car il est instable et rapidement réduit par les catalases et les peroxydases présentes. Toutefois, il est continuellement produit par certaines bactéries du type lactobacilles, lactocoques ou streptocoques évoluant en conditions aérobies et par des leucocytes. Dans un même milieu, certaines cellules bactériennes produisent de l'H_2O_2 pour limiter la croissance d'autres souches, permettant ainsi la prédominance de certaines espèces. Dans la salive et dans le lait, des études ont montré que les quantités de peroxyde d'hydrogène produites étaient suffisantes pour activer la lactoperoxydase (Reiter & Härnulv, 1984). In vitro, il est aussi possible d'activer artificiellement le système LP : soit par ajout direct d'une quantité suffisante d'H_2O_2 ou d'un générateur chimique tel que le peroxyhydrate de carbonate de sodium (Dionysius *et al.*, 1991), soit par addition d'un système générateur enzymatique comme l'association xanthine oxydase / hypoxanthine ou glucose oxydase / glucose.

La première utilisation d'un générateur enzymatique remonte aux années 85-90. L'intérêt de l'utilisation d'un système enzymatique plutôt que l'ajout direct d'H_2O_2, repose sur la libération progressive du peroxyde, ce qui permet le maintien de l'activité lactoperoxydasique dans le temps (Shandholm *et al.*, 1988).

III.4. MODE D'ACTION DU SYSTEME LACTOPEROXYDASIQUE

Les premières hypothèses sur le mode d'action du système ont été émises rapidement après la mise en évidence du pouvoir antibactérien de l'hypothiocyanite. L'activité du système LP a été testée sur des cellules *d'Escherichia coli* sauvages et des cellules dont la membrane a été altérée par action de l'acide ethylène-diamine-tetra-acétique (EDTA) ou par un choc osmotique. L'altération de la membrane favorisant l'action du système, la localisation du site d'action de $OSCN^-$ au niveau de la membrane plasmique a été supposée (Thomas & Aune, 1978a).

Les études suivantes ont montrées que le système LP agit par le biais de dommages membranaires et d'inhibition d'enzymes cytoplasmiques. Ces dommages sont dus à la fixation de l'hypothiocyanite aux groupements SH libres des protéines membranaires et des enzymes clés du métabolisme (Figure 20). La fixation de $OSCN^-$ entraîne une modification du gradient de pH et une fuite d'ion potassium et d'acides aminés. Il en résulte une perturbation des activités cellulaires faisant intervenir des protéines, une inhibition de la chaîne respiratoire et un dérèglement de la synthèse d'ADN et d'ARN (Hui, 1993).

Par la suite, d'autres travaux ont minimisé l'importance des interactions $OSCN^-$ /SH en mettant en évidence l'action de l'hypothiocyanite sur des protéines SH-indépendantes telle que la D-Lactate déshydrogénase (Law & John, 1981).

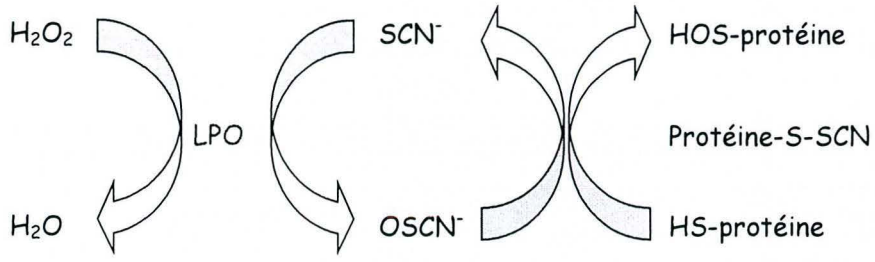


Figure 20 : Mode d'action du système lactoperoxydase / thiocyanate / peroxyde d'hydrogène (Thomas & Aune, 1978b)

Aujourd'hui le mécanisme d'action exact du système n'est toujours pas parfaitement élucidé, son efficacité dépendant du taux de substance antibactérienne produite, du substrat employé pour la LPO et du mode de génération du peroxyde d'hydrogène.

En effet, la lactoperoxydase peut utiliser d'autres substrats que le thiocyanate principalement des halogénures comme I^-, Br^-, Cl^-, IO_3^-. Plusieurs études ont été réalisées en substituant SCN^- par I^- (Ferrari *et al.*, 1997 ; Revol-Junelles *et al.*, 2001). L'iodure a souvent une activité antibactérienne plus marquée que le thiocyanate et de plus petites quantités sont nécessaires pour inhiber significativement les souches (Thomas & Aune, 1978b). Le thiocyanate et l'iodure ont le même site de fixation sur la lactoperoxydase (De Wit & Van Hooijdonk, 1996). L'affinité de la LPO est plus grande pour le thiocyanate que pour l'iodure (Ferrari *et al.*, 1997). Cependant, l'effet antibactérien dû à I^- est plus marqué que celui obtenu avec SCN^- car IO^- forme des complexes plus stables avec les groupements SH (De Wit & Van Hooijdonk, 1996).

Lorsque SCN^- et I^- sont utilisés simultanément, les résultats obtenus sont dépendants du rapport des deux substrats. C'est pourquoi, des résultats contradictoires se retrouvent dans la bibliographie. Avec un rapport SCN^-/I^- égale à 10/100, Thomas (1985) a observé un effet antagoniste des deux substrats.

De même, une étude réalisée avec des proportions de 50/50, 1/5 et 50/5 sur *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, a montré un effet antibactérien plus faible que lorsque le système est constitué seulement de I^- (Ihalin *et al.*, 1998). Au contraire, Bosch *et al.* (2000) ont montré que l'utilisation simultanée du thiocyanate et de l'iodure (10/60) améliore l'activité bactéricide et fongicide du système contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*.

L'utilisation couplée d'un système LP actif et de bactériocines telles que la nisine permet d'élargir le spectre d'action du système et d'obtenir une inhibition de la croissance de *Listeria monocytogenes* supérieure à la somme des effets individuels. Cette synergie permet d'envisager leur utilisation pour un contrôle efficace des flores d'altération (Rodriguez *et al.*, 1997). L'étude de la combinaison du système LP et de la nisine par plans expériences a confirmé cet effet synergique et a mis en évidence l'existence d'effet antibactérien à long terme (Boussouel *et al.*, 1999). Lorsque la nisine est ajoutée en début d'expérience et le système LP dans les 4h suivantes, un effet bactériostatique est d'abord observé contre *Listeria monocytogenes*. Cette phase d'arrêt de croissance est rapidement suivie d'une chute de la population jusqu'à l'absence dans un millilitre (Boussouel *et al.*, 2000).

Le dernier paramètre pouvant influencer l'action du système est le mode de génération du peroxyde d'hydrogène. Lorsque la glucose oxydase est utilisée pour produire H_2O_2, il est nécessaire de maintenir un faible rapport H_2O_2/SCN^- pour que $OSCN^-$ reste le produit d'oxydation majoritaire. Dans le cas contraire, il y a accumulation de peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés d'oxydation ce qui entraîne l'inactivation du système lactoperoxydase (Dionysius *et al.*, 1991). De plus, un excès d'H_2O_2 va entraîner l'oxydation d'$OSCN^-$ et donc diminuer la quantité disponible pour attaquer la membrane (Thomas & Aune, 1978b).

III.5. UTILISATION DU SYSTEME LP

Le rôle naturel exact de la LPO est mal connu mais il consiste probablement en une désinfection du canal gastro-intestinal du veau lors de la tétée, le système LP étant activé grâce au peroxyde d'hydrogène produit par des lactobacilles (Shandholm *et al.*, 1988).

En industrie, de nombreux auteurs ont exploité le LPS pour augmenter le temps de conservation du lait par réduction du développement de la flore pathogène et d'altération. Par exemple, le système permet d'allonger la durée de conservation du lait cru. Couplé à la pasteurisation, cette prolongation peut dépasser 20 jours (Kamau *et al.*, 1991).

Depuis dix ans la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture) s'intéresse au système lactoperoxydasique pour aider à la conservation du lait cru dans les pays en voie de développement. En 1997, en collaboration avec l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), le Codex Alimentarius, la FIL (Fédération Internationale de la Laiterie) et l'Université suédoise d'Uppsala, la FAO a établi un comité d'experts internationaux pour la promotion de la collecte laitière par la méthode de la lactoperoxydase en Afrique de l'ouest. Ce projet appelé « Global Lactoperoxidase Program » (GLP) a débuté au Kenya. Son initialisation repose sur la constatation qu'en Afrique de l'ouest plus de 5 millions de litres de laits sont perdus chaque année suite au manque de système de conservation entre le moment de la traite et l'arrivée à la laiterie. Plus de 80 pays ont témoigné un intérêt pour le système. De 1997 à 2000, la méthode a été testée dans de nombreux pays comme le Pakistan, le Sri Lanka, le Mexique ou l'Ouganda. Aujourd'hui, le procédé est commercialisé en Chine, à Cuba et au Kenya (Figure 21). L'intérêt du système LP est son coût d'utilisation très modéré qui correspond au maximum à 3% du prix du litre de lait cru soit quelques centimes. Le programme entre désormais dans sa phase de consolidation, les essais sont étendus à de nouveaux pays d'Amérique du sud, d'Afrique et d'Asie.

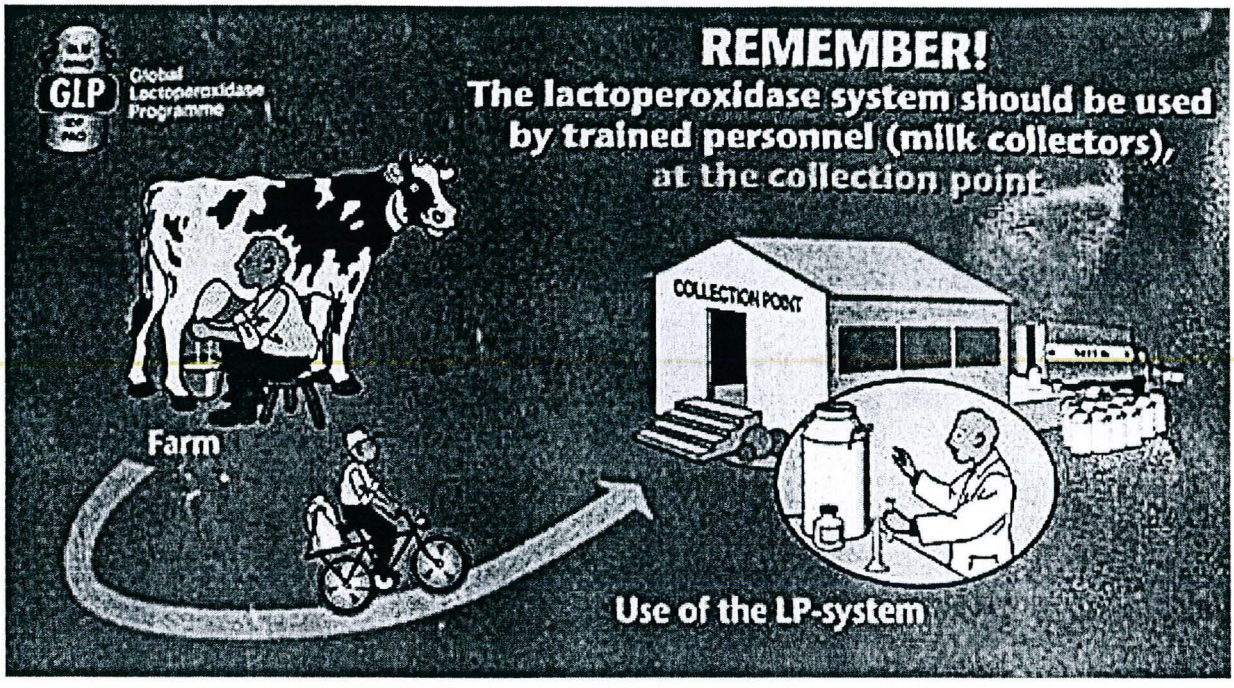


Figure 21 : affiche de vulgarisation de l'utilisation du système lactoperoxydasique dans les pays chauds en voie de développement

Mais, Le LPS a aussi été testé pour de nombreuses autres applications que le lait (Tableau 5).

Produit	*Additifs*	*Fonction*	*Action*
Lait cru	SCN/H_2O_2	conservation	3j/10°C
Lait pasteurisé	SCN/H_2O_2	conservation	21j/10°C
Fromage	SCN/H_2O_2	conservation	8j/4-7°C
Yaourt	LPO	contrôle d'acidité	14j/20°C
Emulsion	LPO/KI/GOD	conservation	14j/20°C
Cosmétique	LPO/KI/SCN/GOD	conservation	2-4 mois
Dentifrice	LPO/SCN/Lysozyme/GOD	cicatrisant	journalier
Ophtalmologie	LPO/KI/SCN/GOD	protection	1 semaine
Anti-tumoral	LPO/GOD/Anticorps	cicatrisant	périodique

Tableau 5 : liste des principales applications du système lactoperoxydasique

Plusieurs brevets ont été déposés sur l'utilisation du système par exemple en médecine, pour les traitements *in vivo* des infections à *Helicobacter pylori* (WO9726908) ou dans des pesticides, pour contrôler les populations de microorganismes phytopathogènes (WO9922597). Aujourd'hui encore le nombre d'applications potentielles du système lactoperoxydase / thiocyanate / peroxyde d'hydrogène ne cesse de s'accroître. Des travaux récents ont montré que l'emploi du système en aquaculture, permet de réduire la mortalité d'environ 30%, lors du sevrage des jeunes poissons. De plus, il permet de lutter efficacement contre les infections du pou de mer. Une réduction de 58% de la population de poux est observable après 48h de traitement (Kussendrager & Van Hooijdonk, 2000).

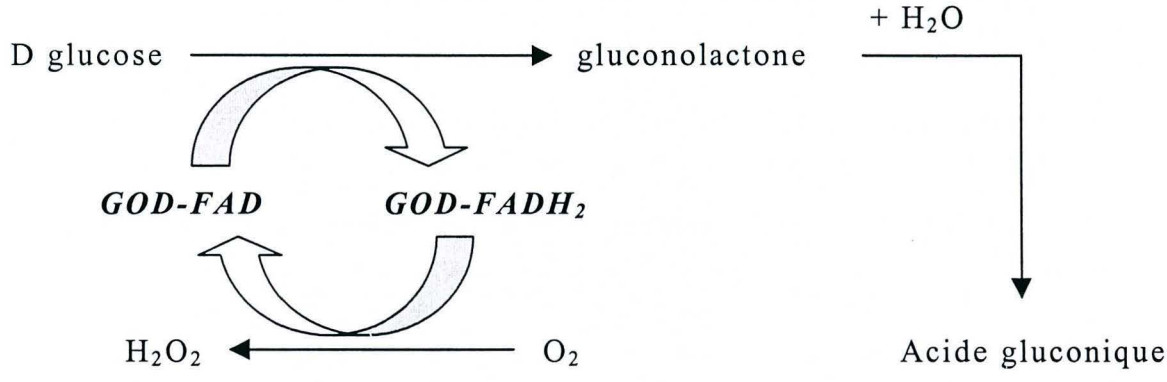
Les produits alimentaires élaborés à partir de lait à système LP actif ne sont pas significativement différents des témoins. Le principal inconvénient de son utilisation est l'augmentation du temps d'affinage ou d'élaboration du produit (production de la flaveur, taux de coagulation ou production d'acide) (Hui, 1993). De plus, des études réalisées avec des cellules HeLa (cellules humaines) et CHO (Chinese Hamster Ovary) ont montré qu'aucun effet toxique n'est décelé lors de l'utilisation du système LP (Reiter & Härnulv, 1984).

Aujourd'hui, la somme des connaissances acquises sur le système, ont conduit à la légitimation de l'association lactoperoxydase, glucose oxydase, glucose, thiocyanate comme auxiliaire technologique. Une fonction d'agent de lutte contre les microorganismes lui a été attribuée par le Codex Alimentarius.

IV. LE SYSTEME GLUCOSE OXYDASE / GLUCOSE

IV.1. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

La glucose oxydase (β-D glucose oxygène 1-oxydoréductase, EC : 1.1.3.4) est une flavoprotéine homodimérique glycosylée (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou non glycosylée (*Phanerochaete chrysosporium*). Elle catalyse l'oxydation du D glucose en gluconolactone secondairement transformée en acide gluconique selon la réaction suivante (Haouz, 1994) :



Cette réaction s'accompagne de la libération de peroxyde d'hydrogène.

La glucose oxydase d'*Aspergillus niger* a une masse molaire de 160 kD et contient 16% de groupements carboxyles (Haouz *et al.*, 2001). C'est une protéine acide, son point isoélectrique est égal à 4.2 (Swoboda & Massey, 1966). Chaque monomère est constitué de 583 acides aminés et possède un pont disulfure qui participe probablement à l'activité enzymatique. Ils contiennent une mole de fer et une mole de FAD chacun (Frederick *et al.*, 1990). L'enzyme est active sur une gamme de pH comprise entre 4 et 7, avec un optimum à 5.5 (Haouz *et al.*, 2001).

IV.2. THERMOSTABILITE

Le frein à l'utilisation de la glucose oxydase est sa faible thermostabilité. En solution, l'enzyme perd rapidement son activité entre 30 et 40°C pour être totalement inactive à 50°C. Cette inactivation est partiellement réversible car après 10 min à 50°C, une partie de l'activité est retrouvée si l'enzyme est placée à température ambiante. Cette activité résiduelle va diminuer lorsque la température augmente, pour disparaître à 70°C. La dénaturation de l'enzyme est en fait de deux types :

✧ **réversible**, lorsque l'augmentation de température n'entraîne que des modifications conformationelles

✧ **irréversible**, lorsque les modifications sont chimiques.

Les deux états sont liés car le taux de modifications chimiques dépend du débobinage de la protéine (Mitsuhiko *et al.*, 1999).

La dénaturation thermique de la glucose oxydase est aussi liée au pH de la solution. Plus l'enzyme est active ; plus sa dénaturation thermique est ralentie. C'est donc au pH optimum de l'enzyme (5.6) que la dénaturation sera la plus faible (Haouz, 1994).

L'immobilisation de l'enzyme est souvent employée pour améliorer la thermotolérance de la glucose oxydase. Malheureusement des problèmes d'inhibition par le peroxyde d'hydrogène existent et freinent le développement économique de ces études (Pitcher, 1980).

IV.3. DEVELOPPEMENT ET UTILISATIONS

Plusieurs travaux se sont axés vers la caractérisation de nouvelles glucose oxydases possédant des propriétés originales d'intérêt industriel. Par exemple, une nouvelle GOD a été isolée chez *Penicillium pinophilum*. Après production, purification et caractérisation, il est apparu que le D-fructose était un bon substrat pour l'enzyme. Dans les fermentations classiques, le D-glucose est utilisé pour induire la production de la GOD. Rapidement, la croissance des cellules et la production de l'enzyme sont inhibées suite à l'acidification du milieu par l'acide gluconique. Par contre, lorsque le D-fructose est employé, la croissance et la production ne sont pas ralenties car il n'y a pas d'acidification du milieu de culture. La quantité d'enzyme produite est donc plus importante (Rando *et al.*, 1997). Une application possible de ces résultats serait la mise au point d'une culture de *P. pinophilum* sur saccharose. Il apparaît comme le substrat le plus approprié à une production à l'échelle industrielle de par son faible coût. De plus, la présence simultanée de glucose et de fructose réduit le taux d'acide gluconique libéré, ce qui diminue le nombre de titrations nécessaires à la régulation du pH. Ces travaux ont mis en évidence que le véritable inducteur de la glucose oxydase serait un métabolite commun au D-glucose et au D-fructose (Rando *et al.*, 1997).

Aujourd'hui, *Aspergillus niger* et *Penicillium amagasakiense* sont utilisées pour produire l'enzyme au niveau industriel ce qui favorise le développement de ces applications.

La principale application de la glucose oxydase est son utilisation en temps que biocapteur, associée ou non à une peroxydase, pour mesurer le taux de glucose ou le taux d'oxygène. En effet, la glucose oxydase fut la première enzyme à être immobilisée dans les années 60 et elle est à l'origine de la notion de biocapteur (Haouz, 1994).

La GOD est aussi appréciée pour sa capacité à réduire le taux d'oxygène ou de glucose dans les aliments ou les boissons (Rando *et al.*, 1997). Elle peut être utilisée pour augmenter le temps de conservation de certaines denrées. Par exemple, la glucose oxydase peut être utilisée pour prolonger le temps de conservation des crevettes.

Placer des crevettes justes pêchées dans une solution enzymatique contenant une glucose oxydase, une catalase et du glucose, le tout maintenu entre 0 et 2°C, retardait le développement des micro-organismes et préservait la qualité du produit (Dondero *et al.*, 1993). D'autres études ont montré que l'utilisation du système GOD / catalase en solution de glucose pouvait allonger la durée de conservation du poisson de 67% (Field *et al.*, 1986).

V. LA MICROENCAPSULATION APPLIQUEE A LA LACTOPEROXYDASE

Plusieurs études ont été réalisées sur l'activation du système lactoperoxydase / thiocyanate / peroxyde d'hydrogène du lait par des enzymes immobilisées.

La première étude date de 1976. L'équipe de Björck (1976) a immobilisé une β-galactosidase et une glucose oxydase afin de produire du peroxyde d'hydrogène à partir du lactose. Par cette étude ils ont démontré la faisabilité d'utilisation d'un générateur enzymatique immobilisé.

Ensuite, à la fin des années 90, plusieurs études se sont succédées sur l'immobilisation de la glucose oxydase et/ou de la lactoperoxydase toujours en vue d'une utilisation dans le lait.

L'équipe de Garcia-Garibay a immobilisé une glucose oxydase et une lactase sur des pelotes de nylon et comparé l'effet obtenu à un ajout direct de peroxyde d'hydrogène. Après 24h à 8°C, La population bactérienne d'un lait cru traité avec 0.75 mM d'H_2O_2 ou par 3 min d'exposition au système générateur immobilisé, est considérablement réduite. La population de coliformes chute de 79% avec les enzymes immobilisées et de 83% avec l'H_2O_2. La population de *Staphylococcus aureus* chute respectivement de 68 et 53%, les psychrotrophes de 91 et 94% et enfin les champignons de 100% quel que soit le traitement. Les mêmes tests réalisés avec un supplément de thiocyanate ont aboutis à des résultats similaires (Garcia-Garibay *et al*, 1995).

Cette étude est intéressante pour démontrer la fonctionnalité des enzymes immobilisées. Cependant, il est nécessaire de rester plus réservé quand à la véritable activation du système LP.

La lactoperoxydase et la glucose oxydase ont été immobilisées dans des liposomes. L'activité antibactérienne obtenue est testée contre des biofilms de *Streptococcus gordonii*. Il apparaît que l'efficacité du système est fonction des temps d'incubation liposomes–biofilms et liposomes-biofilms-substrat et du type de substrat employé. La première partie de l'étude réalisée avec de l'iodure comme substrat pour la lactoperoxydase permet d'obtenir dans les meilleures conditions 40% d'inhibition (Hill *et al.*, 1997). Lorsque SCN^- est utilisé, le taux d'inhibition chute à 17.5%. Si la lactoperoxydase est remplacée par une chloroperoxydase en présence de Cl^-, le taux d'inhibition peut atteindre 67% (Jones *et al.*, 1998).

Une étude plus récente a démontré l'intérêt de la co-immobilisation d'une glucose oxydase et d'une peroxydase à manganèse (MnP) pour la dépollution. Les enzymes sont immobilisées par liaisons covalentes sur des billes de silice poreuses. Le procédé d'immobilisation entraîne de fortes pertes d'activité de 87% pour la glucose oxydase, de 40% pour la peroxydase et de 70% pour le couple GOD/MnP. Toutefois, la stabilité du système immobilisé est meilleure. Après 6 semaines, l'activité résiduelle est de 48% contre seulement 24% pour les enzymes libres (Van Aken *et al.*, 2000)

Ces fortes pertes d'activités suite à l'immobilisation des enzymes soulignent l'importance du choix de la méthode dans la réalisation d'une procédure d'encapsulation.

Le travail de l'équipe de Van Aken (2000), comme plusieurs autres, est une étude de faisabilité qui s'attache plus à démontrer l'intérêt de l'immobilisation d'enzymes pour la réalisation de bioréacteurs continus, plutôt qu'à valider une méthode pour une application industrielle. Aujourd'hui, les publications traitant d'encapsulation de peroxydase et de glucose oxydase sont toutes réalisées dans ce sens.

Notre étude se propose de sortir de ce courant en réalisant une totale encapsulation du système lactoperoxydasique. C'est à dire de mettre au point une microbille autosuffisante contenant la lactoperoxydase, son substrat, et un générateur enzymatique de peroxyde d'hydrogène (GOD, glucose). L'originalité repose donc sur la présence de tous les constituants dans une même unité. Ce principe élargit les domaines d'application du système aux milieux ne contenant pas de substrat oxydable pour la lactoperoxydase et donc accroît considérablement le nombre d'applications industrielles potentielles.

VI. ALIMENTATION ET CONTAMINATION BACTERIENNE

Les maladies liées à la consommation de produits contaminés sont nombreuses. Au 19ème siècle, les épidémies de typhoïde, de brucellose et de diphtérie étaient courantes. Dès 1939 aux Etats Unis et un peu plus tard en France, des exigences en matière de santé, d'hygiène ou de contaminations bactériennes ont permis de réduire les risques pour le consommateur (Hui, 1993). Aujourd'hui, les critères microbiologiques que doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait sont de plus en plus stricts.

Parmi les bactéries pathogènes les plus connues, on peut citer *Clostridium botulinum* qui produit une des plus dangereuse toxine. Il forme des spores, ce qui rend son contrôle difficile ; toutefois sa toxine peut être détruite par chauffage. En France, les bactéries les plus souvent incriminées dans les TIAC (Toxi Infections Alimentaires Collectives) sont les Salmonelles, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens* (Hui, 1993).

Listeria monocytogenes, autre bactérie pathogène impliquée dans de nombreux cas de contamination bactérienne en agroalimentaire, a été choisie comme souche cible pour notre étude.

Listeria monocytogenes est une bactérie Gram-positive, anaérobie facultative, catalase positive. C'est un agent pathogène alimentaire «parfait». Ubiquiste, *Listeria monocytogenes* est très résistante aux conditions difficiles. Sa température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C et son pH optimum entre 6 et 9 (Bergey's manuel, 1986). Cependant, elle peut se développer de 0 à 45°C, sur une gamme de pH variant de 4.5 à 9.6, dans du NaCl à 10% et à une a_w de 0,92 (Brouillaud, 1996).

Listeria monocytogenes est à l'origine de la listériose qui se déclare principalement chez les nouveau-nés, les femmes enceintes ou les personnes présentant une faiblesse immunitaire (Hui, 1993). La listériose peut toucher l'homme et l'animal, mais elle est faiblement contagieuse. L'affection peut revêtir de multiples aspects (Astier-Dumas, 1992).

Les trois principales manifestations d'une listériose sont :

- ✧ **les formes bénignes** : angines, adénites, conjonctivites
- ✧ **les formes neuro-méningées** : expression clinique majeure, 50% de mortalité
- ✧ **les septicémies** : 32% de mortalité

Depuis quelques années, une augmentation de la fréquence des listérioses et de la gravité de l'affection est décelée. Cet accroissement du nombre de cas de listériose dans les pays industrialisés est essentiellement lié à l'allongement des chaînes alimentaires, au développement de la restauration collective et à l'augmentation du nombre et de l'espérance de vie des personnes immunodépressives ou fragilisées (Astier-Dumas, 1992). Mais c'est aussi une conséquence directe du renforcement de la surveillance et du dépistage des contaminations.

Suite à l'épidémie de 1992, la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) a mis en place un plan de surveillance établi en concertation avec les services de la Direction Générale de l'Alimentation.

Ses objectifs sont de repérer les denrées alimentaires les plus sensibles à la contamination par *Listeria monocytogenes*, d'évaluer les progrès réalisés en matière de maîtrise du risque listérien et enfin, de réorienter, si nécessaire, les actions mises en place par les entreprises. Les résultats des plans de 1993 et 1994 montrent que les produits les plus contaminés appartiennent au groupe des produits carnés avec 16% d'unités contaminées ; puis viennent les produits de la mer avec 11% et les produits laitiers, les pâtisseries et les produits végétaux avec respectivement 5, 4 et 5% d'unités contenant *L. monocytogenes*. En conclusion, environ 10% des denrées prélevées au stade de la distribution sont contaminées par *Listeria monocytogenes*. Néanmoins, 88% de ces produits contiennent moins de 100 *Listeria*/g ce qui constitue la limite admissible pour la santé publique (Pierre et Veit, 1996).

La présence de *Listeria monocytogenes* présente donc un risque pour le consommateur mais les retombés économiques pour le producteur ne doivent pas être négligées. Par exemple, une étude épidémiologique a identifié un lot de Brie de Meaux contaminé comme source de contamination initiale. Pour l'industriel, les conséquences furent le retrait du marché des lots suspectés, le renforcement des contrôles et surtout une baisse de 15 à 20% des ventes (Jacquet *et al.*, 1994).

Cette perte de confiance du consommateur est souvent très longue à retrouver, d'autant que le contexte alimentaire actuel est très sensible. Entre la vache folle, la fièvre aphteuse et le poulet à la dioxine, le consommateur réclame de plus en plus de garanties. Les achats deviennent raisonnés et le prix n'est plus un critère décisif. C'est pourquoi, il est nécessaire de poursuivre le développement de nouvelles méthodes de contrôle de la qualité. Notre étude s'inscrit donc parfaitement dans les préoccupations actuelles où les mots d'ordre sécurité et qualité sont dogmes.

MATERIEL & METHODES

Le but de cette étude est de mettre au point une nouvelle formulation du système lactoperoxydasique du lait afin d'en faciliter l'utilisation en industrie. Différents systèmes enzymatiques ont été étudiés tous basés sur la même composition : la lactoperoxydase, son substrat, un générateur de peroxyde d'hydrogène et son substrat. La caractérisation des formulations mises au point, a été réalisée au niveau physico-chimique et biologique.

I. DOSAGES ENZYMATIQUES ET CHIMIQUES

I.1. DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DU GLUCOSE

I.1.1. PRINCIPE

Le dosage du glucose est réalisé grâce à un kit enzymatique BioMérieux (Glucose Enzymatique PAP 1200). La glucose oxydase (GOD) catalyse la conversion du glucose en D glucono-δ lactone ultérieurement transformé en acide gluconique selon la réaction suivante :

$$\text{glucose} \xrightarrow{\textbf{GOD}} \text{acide gluconique} + H_2O_2$$

Cette oxydation s'accompagne de la production d'H_2O_2 dont l'évolution est suivie par spectrophotométrie à 505 nm en présence d'une peroxydase (POD) et de 4 aminoantipyrine :

$$2\ H_2O_2 + \text{phénol} + \text{4-aminoantipyrine} \xrightarrow{\textbf{POD}} \text{quinonéimine} + 4\ H_2O$$

La variation d'absorbance due à la production de quinonéimine (couleur rose) à partir du glucose présent dans la solution, est lue à 505 nm après 20 min d'incubation à 20°C. La coloration obtenue est stable pendant 30 min.

I.1.2. Compositions des reactifs du kit

La composition des deux réactifs fournis dans le Kit est reportée dans le tableau ci dessous (Tableau 6).

Réactif 1	tampon phosphate	150 mmol/l
	Phénol	10 mmol/l
Réactif 2	amino-antipyrine	0,4 mmol/l
	Peroxydase	300 U/l
	Glucose oxydase	15000 U/l

Tableau 6 : liste des réactifs utilisés pour le dosage du glucose

Les réactifs 1 et 2 sont mélangés volume par volume pour obtenir la solution de travail utilisée pour le dosage.

I.1.3. Milieu reactionnel

Solution de travail ..... 1 ml
Echantillon ..... 0.01 ml
Volume final ..... 1,01 ml

Le blanc du dosage est réalisé avec 1 ml de solution de travail. La concentration en glucose d'un échantillon est obtenue par référence à une courbe étalon.

I.1.4. Gamme etalon

A partir d'une solution mère de glucose à 1 g/l, des solutions à 1000, 800, 600, 400, 300, 200 et 100 mg/l sont obtenues par dilution. Après ajout de la solution de travail, leur absorbance est lue à 505 nm. La gamme étalon a été réalisée dans de l'eau distillée. Les mesures sont réalisées en triple afin de calculer une erreur moyenne sur le dosage (Figure 22).

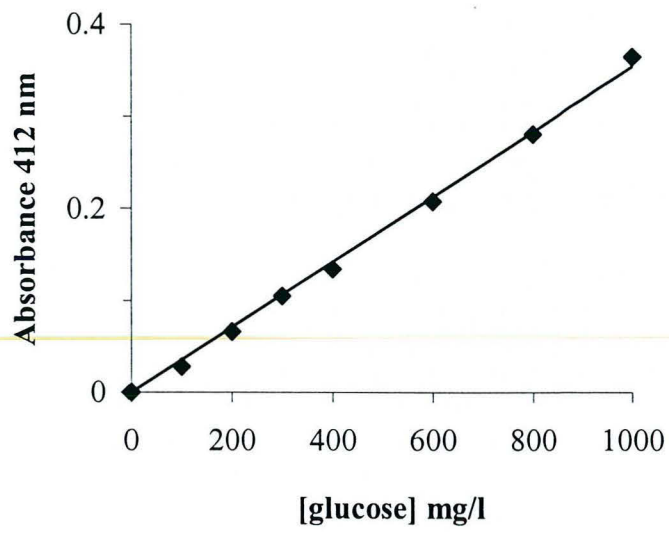


Figure 22 : dosage du glucose dans l'eau par mesure de l'absorbance à 505 nm, mesures réalisées en triple. y = 0.004x, R2 = 0.99

I.2. DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DU THIOCYANATE

D'après Betts & Dainton, 1953

I.2.1. PRINCIPE

L'anion thiocyanate réagit avec Fe^{3+} pour former $FeSCN^{2+}$, complexe de couleur rouge orangée dont l'absorbance est mesurée à 460 nm.

$$Fe^{3+} + SCN^{-} \longrightarrow FeSCN^{2+}$$

I.2.2. MILIEU REACTIONNEL

Echantillon ..... 1,5 ml
Réactif au nitrate ferrique..... 1,5 ml
($Fe(NO_3)_3$, 9 H_2O dans HNO_3, 2M)
Volume final..... 3 ml

I.2.3. MODE OPERATOIRE

L'essai à blanc est réalisé en remplaçant l'échantillon par de l'eau distillée. La valeur de l'absorbance est mesurée dans les dix minutes suivant l'addition de la solution au nitrate ferrique et la concentration en thiocyanate est obtenue par référence à une courbe étalon.

I.2.4. GAMME ETALON

La gamme étalon est réalisée dans de l'eau distillée. Les résultats obtenus sont la moyenne de trois mesures et sont présentés avec la figure suivante (Figure 23).

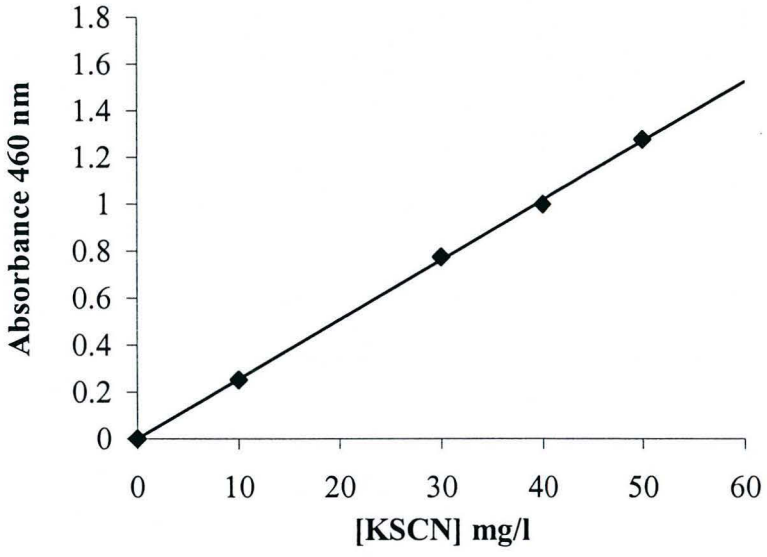


Figure 23 : dosage du thiocyanate en solution dans de l'eau par mesure de l'absorbance à 460 nm, essais réalisés en triple. y = 0.0255 x, R2 = 0.99

I.3. DOSAGE DE L'ACTIVITE LACTOPEROXYDASIQUE

D'après Shindler & Bardsley, 1975.

I.3.1. PRINCIPE

La lactoperoxydase (LPO) transforme le thiocyanate en hypothiocyanite en présence d'H_2O_2 selon la réaction :

$$SCN^- + H_2O_2 \xrightarrow{\textbf{LPO}} OSCN^- + H_2O$$

L'activité de l'enzyme est suivie par spectrophotométrie en présence de 2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) ou ABTS et d'H_2O_2.

$$H_2O_2 + 2\ \underset{\text{(incolore)}}{\text{ABTS}_{\text{réduits}}} \xrightarrow{\textbf{LPO}} \underset{\text{(coloré)}}{2\ \text{ABTS}_{\text{oxydés}}} + 2\ H_2O$$

La variation d'absorbance de l'ABTS est proportionnelle à la quantité de peroxyde utilisé et donc à l'activité de la lactoperoxydase.

I.3.2. MILIEU REACTIONNEL

Solution d'ABTS 1mM en tampon phosphate	2 ml
Solution d'H_2O_2 10 mM	0,021 ml
Echantillon	0,1 ml
Volume final	2,121 ml

I.3.3. MODE OPERATOIRE

Le zéro de l'appareil est obtenu avec 2 ml d'ABTS pré-incubé 5 min dans un bain–marie à 37 °C et 121 µl d'eau distillée. Dans une cuve de spectrophotométrie d'un cm de trajet optique, thermostatée à 37°C, l'ABTS pré-incubé 5 min est introduit et la réaction est initiée par ajout de l'échantillon enzymatique et du peroxyde d'hydrogène.

La variation d'absorbance est mesurée toutes les 10 s pendant 3 min afin de déterminer la vitesse initiale de la réaction, ΔA (min^{-1}).

I.3.4. Calcul de l'activite enzymatique : AE (UI / ml)

$$AE = \frac{\Delta A * 2.121}{\mathcal{E}_m * 0.1 * 10^3}$$

1 UI correspond à l'utilisation d'une µmol d'H_2O_2 dans les conditions du dosage

- $\mathcal{E}m = 1{,}62\ 10^{-2}\ \mu M^{-1}\ .cm^{-1}$ (estimation du coefficient d'extinction molaire de $(ABTS)_2$ dans le respect des conditions stœchiométriques à 412 nm)
- 2,121 : volume final du milieu réactionnel (ml)
- 0,1 : volume de la prise d'essai (ml)

I.4. Dosage de l'activite glucose oxydasique

(Boussouel, 2000)

I.4.1. Principe

La glucose oxydase (GOD) catalyse la transformation du β-D glucose en D glucono - δ lactone selon la réaction :

$$\beta\text{-D glucose} + O_2 \xrightarrow{\textbf{GOD}} \text{D glucono - } \delta \text{ lactone} + H_2O_2$$

Cette oxydation s'accompagne de la production d'H_2O_2 dont l'évolution est suivie par spectrophotométrie à 412 nm en présence de peroxydase et d'ABTS :

$$\underset{\text{(incolore)}}{H_2O_2 + 2\ ABTS_{\text{réduits}}} \xrightarrow{\textbf{Peroxydase}} \underset{\text{(coloré)}}{2\ ABTS_{\text{oxydés}}} + 2\ H_2O$$

La variation d'absorbance de l'ABTS est proportionnelle à la quantité d'H_2O_2 formée donc à l'activité de la GOD.

I.4.2. MILIEU REACTIONNEL

Tampon phosphate (0,1 M)	2,2 ml
D glucose 100 mg/ml	0,5 ml
Peroxydase de raifort (1 mg/ml)	0,02 ml
ABTS (10 µmol/ml)	0,1 ml
GOD (Bio Serae)	0,2 ml
Volume final	3,02 ml

I.4.3. MODE OPERATOIRE

Dans une cuve de spectrophotométrie d'un cm de trajet optique thermostatée à 25 ° C, introduire successivement :

- Tampon P
- D glucose
- Peroxydase
- ABTS

Le blanc de l'appareil est réalisé et la réaction est initiée par ajout de la GOD. La variation d'absorbance est enregistrée toutes les 20 s pendant 6 min afin de déterminer la vitesse initiale de la réaction ΔA (min^{-1}).

I.4.4. CALCUL DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE : AE (UI / mL)

$$AE = \frac{\Delta A * 3.02}{\varepsilon_m * 0.200 * 10_3}$$

1 UI correspond à l'utilisation d'une µmol de D glucose dans les conditions du dosage

✧ $\mathcal{E}m = 1,62\ 10^{-2}\ \mu M^{-1}.cm^{-1}$ (estimation du coefficient d'extinction molaire de $(ABTS)_2$ dans le respect des conditions stœchiométriques à 412 nm)

✧ 3,02 : volume final dans le milieu réactionnel (ml)

✧ 0,200 : volume de la prise d'essai (ml)

I.5. REALISATION DES COURBES DE DISSOLUTION DES POUDRES

La vitesse de dissolution des poudres est déterminée à partir du suivi de la concentration en thiocyanate au cours du temps. Une masse de 500 mg de poudre est placée dans un mini-réacteur à agitation douce par le dessus (Figure 24). Un volume de 50 ml d'eau distillée y est ajouté délicatement pour ne pas favoriser la dissolution de la poudre. Des prélèvements de 12.5 µl sont effectués au cours du temps pour doser la concentration en thiocyanate.

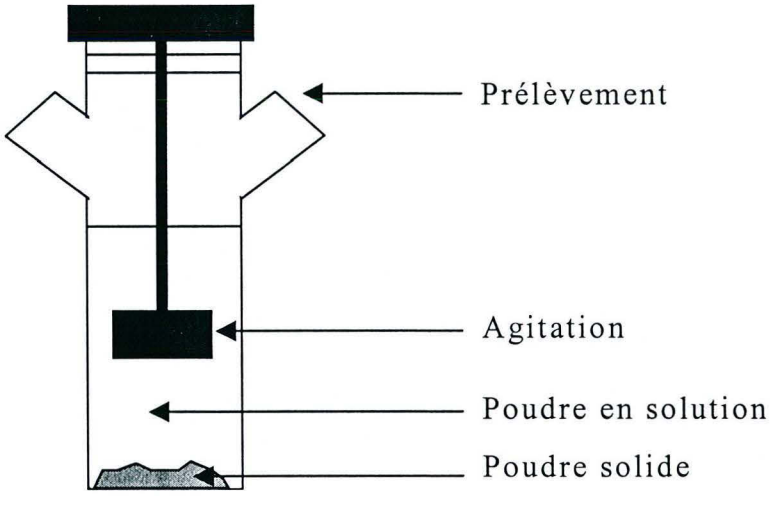


Figure 24 : schéma du procédé utilisé pour réaliser les mesures de dissolution

II. MESURES PHYSICO-CHIMIQUES

II.1. OBSERVATIONS MACRO ET MICROSCOPIQUE DES POUDRES

Les poudres obtenues sont observées directement afin d'apprécier leur couleur, leur texture ou la taille des particules qui la constituent. Ensuite, une étude au niveau microscopique a été réalisée au Laboratoire de Sciences du Génie Chimique (LSGC, ENSIC, INPL) de Nancy. L'observation des microbilles est réalisée avec un microscope électronique à balayage (JEOL JSM T330 A). Les échantillons sont placés sur un cylindre recouvert de papiers autocollants et pelliculés d'une fine couche d'or et de palladium avec un « Fine Coat Ion Sputer » (JFC 1100) afin de permettre leur observation.

II.2. DETERMINATION DE L'HUMIDITE RESIDUELLE

L'humidité résiduelle des échantillons est obtenue par différence de masse avant et après séchage dans une étuve à 110°C. Un gramme d'échantillon est placé dans l'étuve à 110°C pendant 12h. Sa masse est de nouveau mesurée et la quantité d'eau évaporée est ramenée à 100 g de poudre pour obtenir la valeur de l'humidité résiduelle du produit en pourcentage de la masse initiale.

II.3. REALISATION DES ISOTHERMES DE SORPTION

II.3.1. PRINCIPE

Les échantillons sont placés dans des enceintes à humidité relative imposées jusqu'à équilibre entre l'humidité relative de l'air est l'a_w de l'échantillon.

II.3.2. PROTOCOLE

Des échantillons d'1g sont déposés dans des coupelles en inox dont le poids est connu. Chaque coupelle est ensuite introduite dans un bocal contenant une solution sursaturée en sel à Aw connue (Tableau 7). Après 3 semaines, temps nécessaire à l'équilibration, les échantillons sont de nouveau pesés (Greenspan, 1977).

Sels	***LiCl***	***$MgCl_2$***	***NaBr***	***$CuCl_2$***	***KI***	***$SiCl_2$***
a_w	0.1105	0.3300	0.5770	0.6856	0.6876	0.7083
Sels	NaCl	NH_4Cl	KCl	$BaCl_2$	KNO_3	K_2SO_4
a_w	0.7528	0.7710	0.8426	0.9019	0.9541	0.9730

Tableau 7 : Liste des sels utilisés et de leur aw à 20°C

Trois mesures sont réalisées pour chaque sel et la moyenne est utilisée comme résultat. L'humidité initiale de l'échantillon est déterminée en pesant 1g de produit laissé toute une nuit dans une étuve à 110°C. Les mesures obtenues sont traitées avec le logiciel Water Analyser Series 2.05 (Landrock & Proctor, 1951). Parallèlement, la valeur d'a_w de prise en masse est relevée pour chaque échantillon.

II.4. ETUDE DE LA MORPHOLOGIE PAR ANALYSE D'IMAGES

D'après Pons *et al.*, 1997

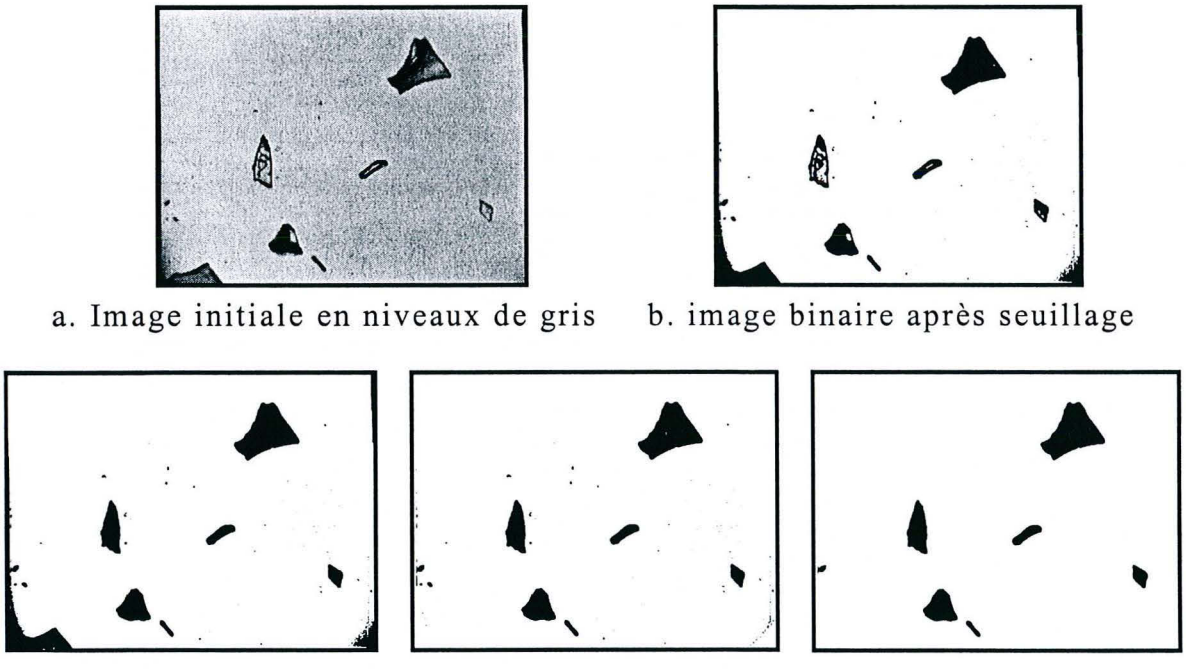
L'analyse d'images est réalisée au Laboratoire de Sciences du Génie Chimique (LSGC, ENSIC, INPL) de Nancy. La morphologie des particules constitutives de l'échantillon est observée par microscopie optique avec un microscope Leitz Dialux 20 et une caméra CCD monochrome reliée à une carte d'acquisition MATROX.

La gestion de l'acquisition de l'image est réalisée grâce au logiciel Visilog 5 (Noesis, Les Ulis, France). Après un prétraitement de l'image, différents descripteurs morphologiques sont calculés :

- ✧ descripteurs macroscopiques : indices d'allongement, circularité
- ✧ descripteurs mésoscopiques : concavité, robustesse

II.4.1. PRETRAITEMENT DES IMAGES

Le but du prétraitement est de générer, à partir d'une image en niveaux de gris, une image binaire contenant la silhouette de la particule. De cette silhouette, une enveloppe convexe est déterminée. La figure suivante reprend les différentes étapes de ce prétraitement avec des particules de lyophilisat (Figure 25). L'image binaire brute est obtenue par segmentation automatique. L'image binaire finale est le résultat de l'élimination des objets en contact avec les bords, du remplissage des objets transparents et de l'élimination du bruit (petits débris et poussières) par érosion – reconstruction. Les objets sont ensuite automatiquement individualisés.



a. Image initiale en niveaux de gris

b. image binaire après seuillage

c. Remplissage particules limites

d. Elimination des de fond

e. Elimination du bruit

Figure 25: étapes du prétraitement de l'image avant analyse, sur des particules de lyophilisat.

II.4.2. DESCRIPTEURS GENERAUX DE FORME

Le descripteur primaire de taille est le diamètre équivalent en surface (D_{eq}), c'est à dire le diamètre du disque de même surface (S) que la silhouette :

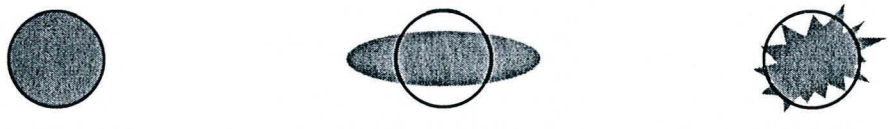
$$D_{eq} = 2\sqrt{S/\pi}$$

La « longueur » est habituellement évaluée à partir du diamètre de Féret maximal (F_{max}) et « l'épaisseur » à partir du diamètre de Féret minimal (F_{min}).

A partir de cette définition de la longueur et de l'épaisseur, des descripteurs morphologiques sont calculés :

- ✧ deux indices d'allongements : $\frac{F_{max}}{F_{min}}$ et $\frac{F_{max}}{D_{eq}}$.
- ✧ la circularité : $C = \frac{P_c^2}{4 * \pi * S}$

où P_c est le périmètre de Crofton de la silhouette. Techniquement le calcul du périmètre est une opération délicate en analyse quantitative d'image. L'estimation fournie par la formule de Crofton semble être la meilleure car elle tient compte du nombre de pixels définissant le contour de la silhouette mais aussi de leur voisinage (pixel de fond et pixel objet). La circularité vaut 1 pour un disque et est supérieure à 1 quand la silhouette s'écarte de cette forme de référence soit parce qu'elle s'allonge soit parce que sa rugosité augmente (Figure 26).



C=1 C>1 et $F_{max}/F_{min}>1$ C>1 et $F_{max}/F_{min} \cong 1$

Figure 26 : distinction des formes à partir de la circularité et de l'allongement

Dans le cas d'agrégats, la notion de concavité est une donnée intéressante. Elle peut se définir par comparaison à une forme de référence convexe, comme l'enveloppe polygonale convexe (Figure 27).

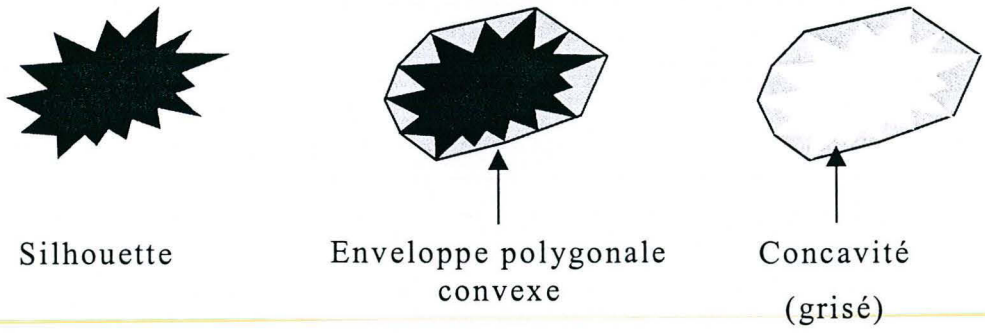


Figure 27 : notion d'enveloppe polygonale convexe

A partir de ces données, deux nouveaux descripteurs de forme peuvent être calculés :

- ✧ La robustesse : $R = \frac{2\omega_1}{\sqrt{S}}$
- ✧ L'indice de plus grande concavité (PGC) : $PGC = \frac{2\omega_2}{\sqrt{S}}$

où ω_1 est le nombre d'érosions morphologiques nécessaires pour faire disparaître la silhouette et ω_2 son complément par rapport à l'enveloppe polygonale convexe. L'intérêt de la robustesse est qu'elle permet une mesure généralisée de l'allongement des particules, qu'elles soient rectilignes ou courbes.

Les indices calculés sont ensuite systématiquement comparés à ceux du disque, repris dans le tableau ci-après (Tableau 8).

	Circularité	F_{max}/F_{min}	F_{max}/D_{eq}	***Robustesse***	***PGC***
Disque	1	1	1	0.8	0

Tableau 8 : Valeurs des descripteurs morphologiques d'un disque

II.5. ETUDE DE LA REPARTITION GRANULOMETRIQUE DES POUDRES

La distribution granulométrique des poudres est étudiée par diffraction laser avec un Malvern Mastersizer S banc long (Malvern Instrument). La taille est étudiée en voie sèche et en voie humide en suspension dans l'éthanol à 95%. Pour les mesures en voie sèche, une lentille de 1000 mm, couvrant une plage granulométrique de 4.2 à 3480 µm, est utilisée. Lorsque l'étude se fait par voie humide, une lentille de type 300 RF est utilisée. Les tailles allant de 0.05 à 900 µm sont mesurées. L'analyse est réalisée automatiquement grâce au logiciel Malvern accompagnant le granulomètre. L'analyse est effectuée en mode polydispersé qui ne fait aucune supposition quant à la distribution granulométrique de l'échantillon. Les résultats sont présentés selon le modèle « standard sèche » ou « standard humide ». La mesure obtenue est en volume. Elle est considérée comme acceptable lorsque la valeur du résiduel est proche de 1%. Pour chaque analyse, le d_{10}, d_{50} et d_{90} sont relevés ainsi que le span ou largeur de la distribution.

$$\text{Span} = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}}$$

- ✧ d_{10} : taille pour laquelle 10 % de l'échantillon se trouve en dessous
- ✧ d_{50} : taille pour laquelle 50 % de l'échantillon se trouve en dessous
- ✧ d_{90} : taille pour laquelle 90 % de l'échantillon se trouve en dessous

II.6. ANALYSE CHIMIQUE PAR REFLEXION DIFFUSE PAR INFRAROUGE

Les études de spectrométrie infrarouge sont réalisées au Laboratoire Environnement et Minéralurgie de l'Ecole Nationale Supérieure de Géologie (Nancy, France).

II.6.1. Principe

La réflexion diffuse par infrarouge permet d'obtenir des informations chimiques sur la surface des échantillons testés. D'une façon générale, trois facteurs doivent être pris en compte pour analyser un spectre infrarouge : la position des bandes d'absorption, leurs intensités relatives et leurs formes. Chaque fonctionnalité chimique émet spécifiquement une bande d'élongation et une bande de déformation qui donnent des informations directes sur la nature chimique de l'échantillon (Tableau 9).

Fonctionnalités	*Fréquence (cm^{-1})*		*Remarques*
	Elongation	*Déformation*	
OH	3650-2500	<1680	Plus de liaisons hydrogènes, plus les fréquences sont basses et les bandes larges
NH	3600-2800	1680-1400	Amine/amide I^{r} simple liaison, amine/amide II^{r} double liaison
CH	2970-2845	1480-1370	CH vinyliques et aromatiques : bande d'élongation entre 3150-3000 cm^{-1}
C=O	1815-1400	-	↘ de fréquence = perte de double liaison
C=C	1660-1620	-	Aromatiques : fréquence entre 1650-1450 cm^{-1} (vibration du cycle)
C-O	1370-1070	-	Facile à détecter, Pour les époxy, fréquence plus basse : 950-810 et 840-750 cm^{-1}

Tableau 9 : caractéristiques de l'absorption infrarouge des principales fonctionnalités chimiques (De Donato *et al.*, 1999)

II.6.2. PROTOCOLE

Les spectres infrarouge sont réalisés avec un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (Brucker IFS 55) relié à une unité de réflexion diffuse (Harrick Corporation). Le détecteur est du type MCT refroidi à la température de l'azote liquide. La résolution est de 2 cm^{-1}. Les échantillons sont broyés grossièrement pour briser les agrégats et sont dilués dans une matrice de KBr qui n'absorbe pas. La répartition est de 70 mg d'échantillon pour 370 mg de KBr. Les spectres obtenus sont exprimés en unité d'absorbance c'est-à-dire : $unité = \frac{\log R_{KBr}}{\log R_{test}}$ où R est l'intensité de la diffusion.

II.7. STRUCTURE CHIMIQUE PAR DIFFRACTION DES RAYONS X

Comme les spectres infrarouge, les diffractogrammes ont été réalisés au Laboratoire Environnement et Minéralurgie de l'Ecole Nationale Supérieure de Géologie (Nancy, France).

II.7.1. PRINCIPE

L'étude de la structure chimique d'un composé par rayons X repose sur la diffraction du rayonnement par la présence d'une structure cristalline organisée. L'observation des phénomènes de diffraction n'est possible que sous deux conditions :

- ✧ La longueur d'onde du faisceau incident est du même ordre de grandeur que les périodes du réseau cristallin
- ✧ Tous les éléments diffusants diffusent un rayonnement en phase.

Cette dernière condition est énoncée par la loi de Bragg :

$$2d_{hkl}\sin\theta = n\lambda$$

où d_{hkl} est la distance entre deux plans d'indice hkl du composé, θ l'angle que forme le vecteur d'onde incident avec le plan hkl, λ la longueur d'onde du rayonnement incident et n un nombre entier correspondant à l'ordre de la réflexion.

D'un point de vue technologique, l'angle θ est mesuré ce qui permet de connaître les distances entre les différents plans de l'échantillon testé. Lorsque l'échantillon testé présente une structure cristalline, le diffractogramme est composé de pics dont la position reproduit la distance entre les plans de périodicité.

II.7.2. PROTOCOLE

Les diffractogrammes sont réalisés sur un diffractomètre Jobin Yvon Sigma 2080 opérant par réflexion. Il utilise le rayonnement $K_{\alpha 1}$ du cuivre dont la longueur d'onde est de 1.5406 Å. L'échantillon est testé sous une forme désorientée c'est-à-dire que les particules qui le composent ne sont pas organisées. Les mesures de diffraction sont effectuées sur 50 mg d'échantillon déposés sur un porte-échantillon vertical.

II.8. PROPRIETES RHEOLOGIQUES DES POUDRES

Les propriétés rhéologiques des poudres ont été étudiées avec un testeur de poudre Hosokawa. Cet appareil regroupe plusieurs expériences basées sur les travaux de Carr (1965). La succession de neuf mesures indépendantes permet de définir différents critères : l'angle de repos, la densité aérée, la densité tapée, la compressibilité, l'angle de spatule, la cohésion, l'angle de chute, l'angle de différence et la dispersibilité. La combinaison de ces paramètres permet par la suite de calculer des indices représentatifs de l'aptitude à l'écoulement de la poudre ou « flowability » et de son aptitude à la fluidisation ou « floodability ». Aujourd'hui ces deux termes ne sont pas encore parfaitement clarifiés et particulièrement la « floodability ». Selon Carr (1965), la « floodability » d'une poudre est sa tendance à s'écouler comme un liquide suite à une fluidisation naturelle des particules par l'air mais pour d'autres auteurs, la « floodability » représente l'étude du mouvement des particules formant une poudre lorsque cette dernière passe d'un état de repos à un état de mouvement suite à une contrainte (Kouadri-Henni *et al.*, 1999).

Actuellement, plusieurs traductions françaises cohabitent comme indice de foisonnement, de fluidisation ou d'éboulement. De ce fait, en l'absence de définition unique, nous conserverons le terme anglais de « floodability » pour ne pas limiter son sens tout en conservant l'image d'indice de la tendance d'une poudre à fuser c'est-à-dire à être entraînée par l'air. Dans un souci d'homogénéité, nous ferons de même avec le terme de « flowability » qualifiant la tendance à l'écoulement d'une poudre.

II.8.1. DETERMINATION DE L'INDICE DE « FLOWABILITY »

L'indice de « flowability » est calculé à partir des mesures de l'angle de repos, la compressibilité, l'angle de spatule et la cohésion de la poudre à tester.

– *CALCUL DE L'ANGLE DE REPOS*

L'angle de repos est égal à la valeur de l'angle $\propto$ que fait la pente d'un tas de poudre obtenu aléatoirement et l'horizontal (Figure 28).

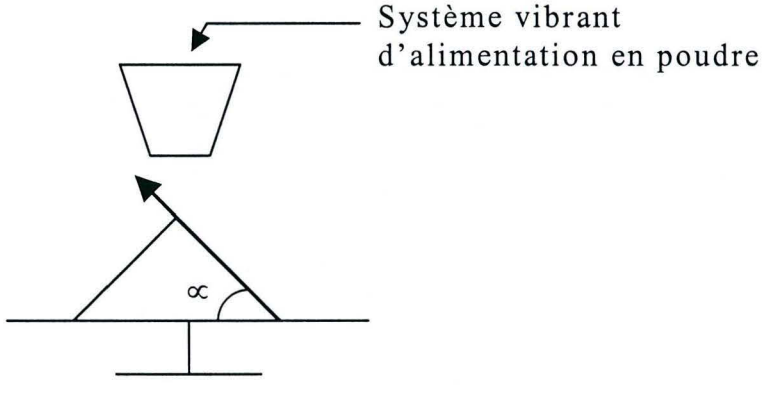


Figure 28 : principe de mesure de l'angle de repos

Plus la valeur de l'angle mesurée est faible, plus la poudre a un bon écoulement. L'angle de repos est directement lié à la taille des particules, leur porosité, la cohésion de la poudre et sa fluidité.

– *DETERMINATION DE LA COMPRESSIBILITE*

La compressibilité d'une poudre est calculée à partir des mesures de densités aérée et tassée apparentes :

$$C = \frac{(P-A)*100}{P}$$ avec P : densité tassée et A : densité aérée

La densité apparente aérée est obtenue en faisant le rapport entre la masse de poudre et un volume donné : M_1/V (Figure 29).

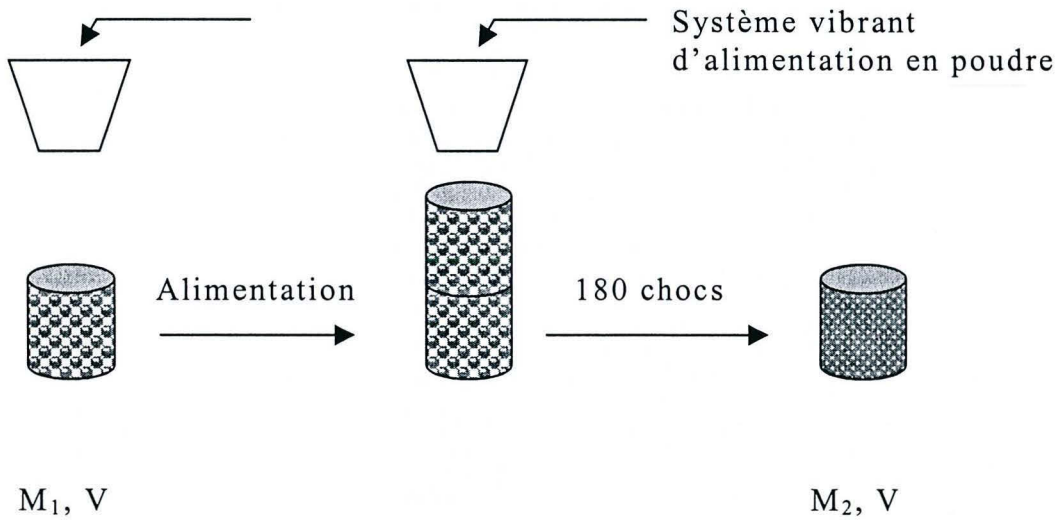


Figure 29: principe de la mesure des densités apparentes aérée et tassée

La poudre est tassée par à une succession de 180 chocs. La masse de poudre tassée est mesurée (M_2) et le rapport M_2/V est calculé afin d'obtenir la valeur de la densité tassée apparente.

Plus une poudre est compressible, plus son écoulement peut être bon. La compressibilité dépend principalement : de l'uniformité de taille et de forme, la déformabilité des particules, leur surface, la cohésion et l'humidité de la poudre.

- *CALCUL DE L'ANGLE DE SPATULE*

Une quantité de poudre suffisante est déposée arbitrairement sur une spatule. L'inclinaison du tas de poudre obtenu est mesurée en trois points afin de déterminer l'angle de spatule avant impact. Après la mesure, l'éboulement de la poudre est simulé par un choc et la nouvelle valeur d'angle est mesurée et appelée angle de spatule après impact. La valeur prise en compte est la moyenne des deux angles précédemment calculés (Figure 30).

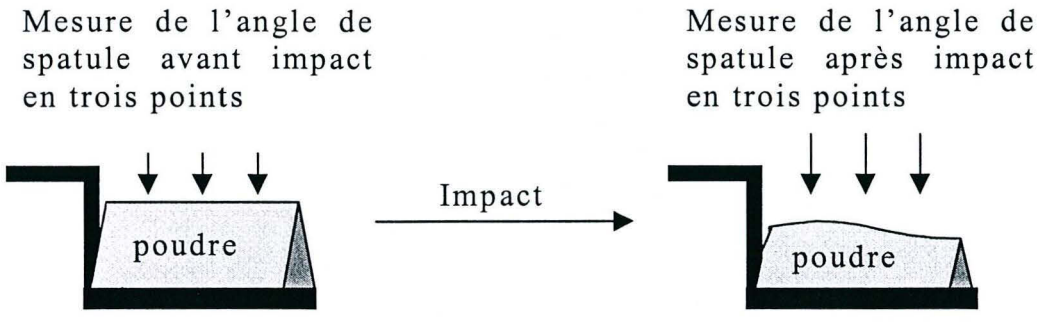


Figure 30 : détermination de l'angle de spatule par mesure successive de l'angle que forme la poudre sur la spatule avec l'horizontale avant et après impact.

Une poudre qui possède une bonne aptitude à l'écoulement aura tendance à former un angle unique de faible valeur. Si les propriétés d'écoulement sont mauvaises, le prisme formé sera de forme irrégulière et la valeur moyenne de l'angle de spatule souvent supérieur à 40°. Les caractéristiques de l'angle de spatule dépendent principalement de la cohésion de la poudre, sa surface, la taille des grains, leur forme et leur uniformité mais aussi de la fluidité, la porosité et la déformabilité des particules.

– *DETERMINATION DE LA COHESION*

La dernière mesure prise en compte pour déterminer l'indice de « flowability » est la cohésion de la poudre étudiée. La mesure de la cohésion se fait par tamisage.

Trois tamis de 75, 150 et 250 µm sont superposés, la maille des tamis est déterminée automatiquement par l'appareil en fonction des valeurs de densités tassée et aérée. Deux grammes de poudre sont déposés sur le tamis à plus large maille (250 µm). Les tamis sont agités durant 84 sec et la quantité de poudre restante sur chaque tamis est pesée (Figure 31).

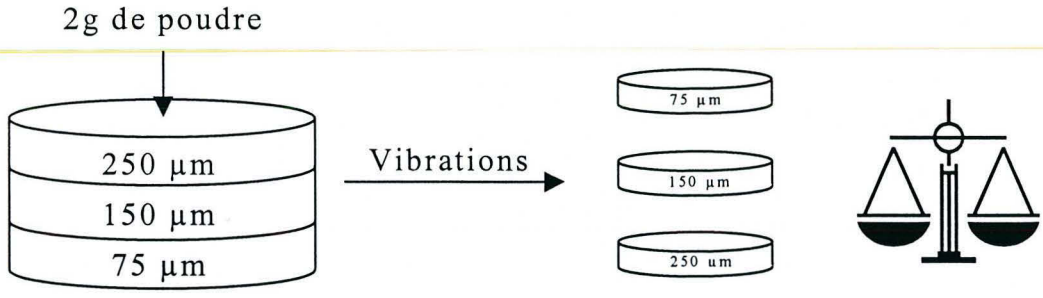


Figure 31 : principe de la détermination de la cohésion d'une poudre

Si les deux grammes de poudres se retrouvent dans le tamis de 200 µm, la poudre est dite 100 % cohésive. Si les deux grammes passent le plus petit tamis (75 µm), la poudre est 0 % cohésive. Les cas intermédiaires sont calculés en fonction de la masse de poudre présente sur chaque tamis :

- ✧ 5 % par 0.1 g de poudre présent sur le tamis de 250 µm
- ✧ 3 % par 0.1 g de poudre présent sur le tamis de 150 µm
- ✧ 1 % par 0.1 g de poudre présent sur le dernier tamis de 75 µm.

La valeur de la cohésion sera égale à la somme des pourcentages obtenus pour chaque tamis. Cette méthode est une mesure directe de l'énergie nécessaire pour briser les agrégats de poudre sur un temps donné. Des phénomènes d'adhésion ou d'attraction électrostatique des petites particules sur les plus grosses faussent la mesure. C'est pourquoi ce critère reste très indicatif et non véritablement représentatif de la cohésion d'une poudre.

– - *DETERMINATION DE L'INDICE DE « FLOWABILITY »*

A partir de ces quatre résultats, un indice de « flowability » est calculé en se référant à un tableau de standard établi par Carr (1965). Un total de point est obtenu pour chaque expérience et la somme de ces quatre notes donne la valeur de l'indice de « flowability » et les caractéristiques générales d'écoulement de la poudre (Tableau 10).

Angle de repos		Compressibilité		Angle de spatule		Cohésion		« Flowability »
Deg	Pts	%	Pts	Deg	Pts	%	Pts	
25	25	5	25	25	25			Excellente, 90-100 pts
26-29	24	6-9	23	26-30	24			Pas besoin d'aide
30	22.5	10	22.5	31	22.5			Pas de voûte
31	22	11	22	32	22			Bonne, 80-89 pts
32-34	21	12-14	21	33-37	21			Pas besoin d'aide
35	20	15	20	38	20			Pas de voûtes
36	19.5	16	19.5	39	19.5			Correcte, 70-79 pts
37-39	18	17-19	18	40-44	18			Pas d'aide
40	17.5	20	17.5	45	17.5			
41	17	21	17	46	17			Passable, 60-69 pts
42-44	16	22-24	16	47-59	16			Peut accrocher
45	15	25	15	60	15	<6	15	
46	14.5	26	14.5	61	14.5	6-9	14.5	Médiocre, 40-59 pts
47-54	12	27-30	12	62-74	12	10-29	12	Agitation et vibrations
55	10	31	10	75	10	30	10	
56	9.5	32	9.5	76	9.5	31	9.5	Très médiocre, 20-39 pts
57-64	7	33-36	7	77-89	7	32-54	7	Agitation obligatoire
65	5	37	5	90	5	55	5	
66	4.5	38	4.5	91	4.5	56	4.5	Très mauvaise, 0-19 pts
67-89	2	39-45	2	92-99	2	51-79	2	Agitation spéciale
90	0	>45	0	>99	0	>79	0	

Tableau 10 : grille d'évaluation de l'indice de « flowability » selon Carr (1965)

II.8.2. DETERMINATION DE L'INDICE DE « FLOODABILITY »

L'indice de « floodability » est calculé à partir de quatre critères : l'indice de « flowability » précédemment calculé, l'angle de chute, l'angle de différence et la dispersibilité.

– - *DETERMINATION DE L'ANGLE DE CHUTE*

A partir du tas de poudre obtenu lors de la mesure de l'angle de repos, l'éboulement de la poudre est provoqué par une succession de 3 chocs. La mesure de l'angle formé par la pente du tas de poudre obtenu et l'horizontal donne la valeur de l'angle de chute (Figure 32).

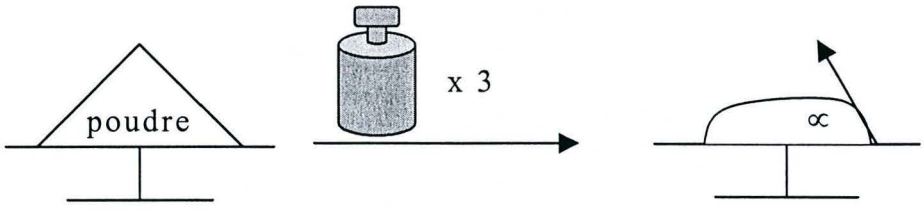


Figure 32: méthode de détermination de l'angle de chute

Plus la poudre à une aptitude prononcée à la fluidisation, plus la valeur de l'angle sera faible. En effet, la présence d'air dans la poudre aura tendance à favoriser l'effondrement du tas formé. L'angle de chute va dépendre principalement de la fluidité de la poudre, la forme, la taille et l'uniformité des particules et enfin la cohésion.

– - *CALCUL DE L'ANGLE DE DIFFERENCE*

La valeur de l'angle de différence s'obtient en soustrayant la valeur de l'angle de chute à celle de l'angle de repos :

A. de différence = A. de repos – A. de chute (Deg)

Une différence importante traduit une tendance à l'éboulement caractéristique des poudres à indice de « flowability » élevé.

– - *MESURE DE LA DISPERSIBILITE*

La quantification de la dispersibilité d'une poudre se fait par mesure de la différence de masse avant et après une chute d'une hauteur définie (Figure 33).

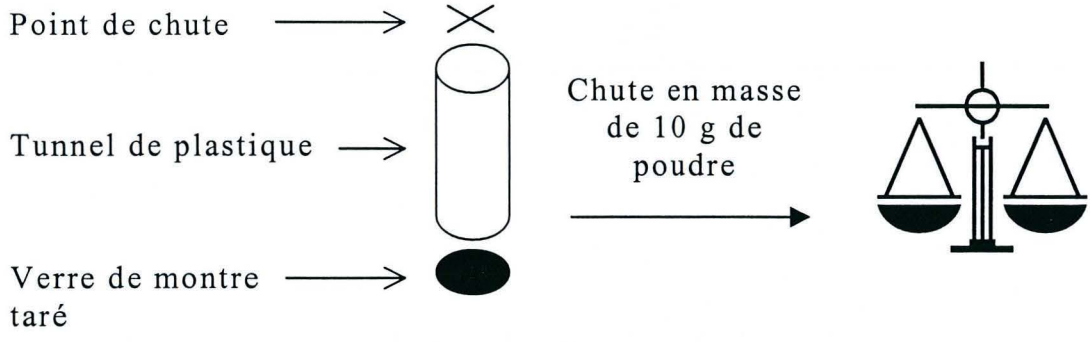


Figure 33: appareil utilisé pour la détermination de la dispersibilité

Dix grammes de la poudre à tester sont lâchés en masse au-dessus d'un verre de montre préalablement taré. Un cylindre de plastique canalise la chute. La quantité de poudre récupérée dans le verre de montre est déterminée par pesée et la dispersibilité est mesurée selon la formule :

$$\text{Dispersibilité (\%)} = 10 - (\text{masse poudre récupérée}) \times 10$$

– - *DETERMINATION DE L'INDICE DE « FLOODABILITY »*

Comme pour l'indice de « flowability », l'indice de « floodability » est calculé à partir d'un tableau de standards (Tableau 11). Les points attribués à chaque caractéristique ont été déterminés à partir d'expériences réalisées avec de l'amidon possédant un indice de « floodability » très élevé (Carr, 1965).

Pour chaque expérience, une note est obtenue et la somme de ces quatre notes donne l'indice de « floodability » de la poudre étudiée.

« Flowability »		Angle de chute		A. de différence		Dispersibilité		« Floodability »
tab. 1	Pts	Deg	Pts	Deg	Pts	%	Pts	
60+	25	10	25	30+	25	50+	25	
59-56	24	11-19	24	29-28	24	49-44	24	Très « floodable »,
55	22.5	20	22.5	27	22.5	43	22.5	80-100 pts
54	22	21	22	26	22	42	22	Adaptation du
53-50	21	22-24	21	25	21	41-36	21	matériel d'évacuation
49	20	25	20	24	20	35	20	
48	19.5	26	19.5	23	19.5	34	19.5	
47-45	18	27-29	18	22-20	18	33-29	18	« floodable »,
44	17.5	30	17.5	19	17.5	28	17.5	60-79 pts
43	17	31	17	18	17	27	17	Peut nécessiter une
44-40	16	32-39	16	17-16	16	26-21	16	adaptation
39	15	40	15	15	15	20	15	
38	14.5	41	14.5	14	14.5	19	14.5	Tend à fuser,
37-34	12	42-49	12	13-11	12	18-11	12	40-59 pts
33	10	50	10	10	10	10	10	
32	9.5	51	9.5	9	9.5	9	9.5	Peut parfois fuser,
31-29	8	52-56	8	8	8	8	8	25-39 pts
28	6.25	57	6.25	7	6.25	7	6.25	
27	6	58	6	6	6	6	6	
26-23	3	59-64	3	5-1	3	5-1	3	Ne fuse pas,
<23	0	>64	0	0	0	0	0	0-24 pts

Tableau 11 : Grille d'évaluation de l'indice de « floodability » selon Carr (1965)

Une poudre très « floodable », c'est-à-dire très fusante et dispersible, peut avoir un écoulement correct mais instable. Son utilisation en industrie implique souvent l'adaptation des installations avec par exemple, des systèmes de déchargement à valves rotatives ou à roue étoilée et une agitation pour éviter la formation de voûtes. En conclusion, l'analyse d'une poudre avec le Powder Tester Hosokawa est une analyse multicritères. La réalisation de plusieurs expériences discrètes va permettre de déterminer deux indices caractérisant la « flowability » et la « floodability » de la poudre.

III. METHODES MICROBIOLOGIQUES

III.1. MICROORGANISMES

La souche *Listeria monocytogenes* CIP 82110 est retenue comme souche cible principale. Elle est conservée à – 20°C en bouillon TSBYE (Trypcase soja 30 g/l, extrait de levure 6 g/l). Avant les expérimentations, la souche est repiquée deux fois dans du bouillon TSBYE stérilisé en autoclave à 120°C pendant 15 min puis incubée 24 h à 37°C. Les spectres d'activité des microbilles sont effectués contre 8 souches dont *Listeria monocytogenes*. Leur nom et leur température optimale de croissance sont récapitulés dans le tableau suivant (Tableau 12).

Souches	***Températures***
Escherichia coli CIP 54.8	37°C
Flavobacterium meningosepticum CIP 6057	30°C
Listeria monocytogenes CIP 82 110	37°C
Pseudomonas fluorescens CIP 69.13	30°C
Salmonella enterica subsp. *enterica* serotype *enteritidis* CIP 81.3	37°C
Shewanella putrefaciens CIP 80.40	30°C
Staphylococcus aureus subsp. *aureus* CIP 7625	37°C
Vibrio parahaemolyticus CIP 78.26	30°C

Tableau 12 : liste des souches cibles et de leur température optimale de croissance

Les pré-cultures de ces différentes souches sont réalisées dans les mêmes conditions que lors de l'utilisation de *Listeria monocytogenes*.

III.2. SYSTEMES ENZYMATIQUES ANTIBACTERIENS

III.2.1. CHOIX DES SYSTEMES ANTIBACTERIENS

Les études préalablement réalisées dans l'équipe de Microbiologie Alimentaire du laboratoire nous ont encouragés à choisir le système lactoperoxydase / thiocyanate / peroxyde d'hydrogène (LPS) faisant intervenir l'association glucose oxydase / glucose comme générateur d'H_2O_2 et sa variante où le thiocyanate de potassium (KSCN) est substitué par de l'iodure de potassium (KI). Ce dernier système a été retenu car l'effet antibactérien obtenu avec I^- est plus marqué que celui obtenu avec SCN^- (Revol-Junelles *et al.*, 2001). De plus, la substitution de SCN^- par I^- permet de quantifier l'impact du thiocyanate sur la stabilité du système encapsulé. Enfin, un système témoin sans lactoperoxydase, a été réalisé pour quantifier la part d'activité due à la production de peroxyde d'hydrogène par la glucose oxydase (Tableau 13).

Noms	***LPS « classique »*** ***S***	***LPS « substitué »*** ***SI***	***Témoin H_2O_2*** ***SH***
Enzymes	LPO GOD	LPO GOD	LPO GOD
Substrats	D Glucose KSCN	D Glucose KI	D Glucose

Tableau 13 : systèmes enzymatiques retenus comme modèles de l'étude (LPO : lactoperoxydase, GOD : glucose oxydase)

III.2.2. COMPOSITIONS DES SOLUTIONS A SECHER

La composition initiale de la solution à sécher a été déterminée suite aux données microbiologiques obtenues lors de travaux préalables au laboratoire dans l'équipe de Microbiologie Alimentaire.

Les concentrations en glucose (Sigma, France) et en thiocyanate de potassium (Labosi, France) sont respectivement de 200 mg/l et 40 mg/l. La concentration de la gomme acacia (Colloids Natural Internationale, France) a été arrêtée à 10 %. Cette composition est appelée solution originale ou S_1 pour le LPS « classique », SI_1 pour le LPS « substitué » et SH_1 pour le témoin H_2O_2 (Tableau 13). Conjointement, différents rapports substrats/polymère compris entre 0.2 et 50 % sont testés. Les solutions sont obtenues en multipliant les concentrations de la solution initiale par un coefficient croissant (Tableau 14 au Tableau 16).

Nom	S_1	S_{10}	S_{50}	S_{100}	S_{200}	S_{400}
Coefficient multiplicatif des concentrations initiales	1	10	50	100	200	400
Rapport substrats / polymère (%)	0.24	2.4	10.6	19.3	32.4	48.9
Glucose (g/l)	0.2	2	10	20	40	80
Thiocyanate de potassium (g/l)	0.04	0.4	2	4	8	16

Tableau 14 : compositions des noyaux secs destinés à activer le système lactoperoxydasique « classique »

Nom	SI_1	SI_{10}	SI_{50}	SI_{100}	SI_{200}	SI_{400}
Coefficient multiplicatif des concentrations initiales	1	10	50	100	200	400
Rapport substrats / polymère (%)	0.24	2.4	10.6	19.3	32.4	48.9
Glucose (g/l)	0.2	2	10	20	40	80
Iodure de potassium (g/l)	0.04	0.4	2	4	8	16

Tableau 15 : compositions des noyaux secs destinés à activer le système lactoperoxydasique « substitué »

Nom	SH_1	SH_{10}	SH_{50}	SH_{100}	SH_{200}	SH_{400}
Coefficient multiplicatif des concentrations initiales	1	10	50	100	200	400
Rapport substrat / polymère (%)	0.2	2	8.9	16.1	27	40.8
Glucose (g/l)	0.2	2	10	20	40	80

Tableau 16: compositions des noyaux secs destinés à quantifier l'activité antibactérienne liée à la production de peroxyde d'hydrogène par la glucose oxydase (système témoin)

III.3. METHODE DES CERCLES D'INHIBITION

Cette méthode est une technique semi-quantitative de visualisation de l'activité antibactérienne d'un produit sec. Elle est basée sur le principe des antibiogrammes utilisés pour tester l'activité d'un antibiotique (Barry *et al.*, 1970).

III.3.1. PRINCIPE

La poudre à tester est déposée à la surface d'une gélose contenant la souche cible prise dans la masse. La lactoperoxydase et la glucose oxydase sont aussi incluses dans la masse lorsque les tests sont réalisés avec les noyaux des microbilles qui ne contiennent pas d'enzyme. Le diamètre des cercles d'inhibition obtenus est mesuré au cours du temps (Figure 34). Le suivi de l'évolution de ce diamètre s'effectue sur 120h. Si, après 120h, aucune repousse n'est observée dans la zone d'inhibition, l'effet du système sera qualifié de bactéricide. Si, la souche colonise de nouveau la zone d'inhibition, alors, l'effet sera dit bactériostatique.

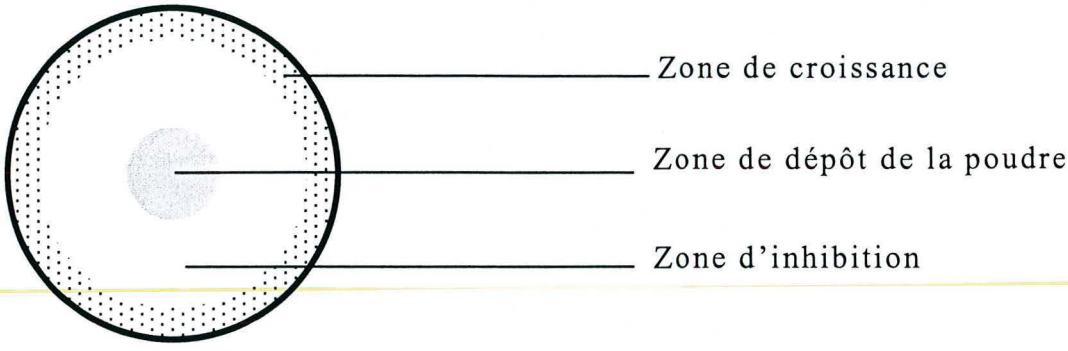


Figure 34 : principe de la méthode des cercles d'inhibition en boite de Petri

III.3.2. PROTOCOLE

Une pré-culture de la souche choisie comme cible est réalisée en milieu TSBYE (Trypcase soja 30 g/l et extrait de levure 6 g/l). Le tube ensemencé est placé à la température optimale de croissance de la souche. Après 24h de pré-culture, l'absorbance de la culture est mesurée à 660 nm afin de déterminer le volume nécessaire pour ensemencer 100 ml de milieu gélosé TSAYE (trypcase soja 30 g/l, extrait de levure 6 g/l, agar 8 g/l) pour parvenir à une population finale de 10^4 UFC / ml (Abs = 0,001).

$$\text{Volume à prélever} = \frac{0{,}001 * 100}{\text{Abs mesurée}}$$

Lorsque le test est réalisé avec les noyaux seuls, des solutions mère de lactoperoxydase (Bio Serae, France) et glucose oxydase (Bio Serae, France) sont préparée 100 fois concentrées pour obtenir une concentration finale de respectivement 35 mg/l (142 U/mg) et 1 mg/l (45 U/mg) dans les 100 ml de TSAYE. Ces solutions enzymatiques sont stérilisées par filtration sur filtres Millipore 0.22 µm (Millipore Corp., Bedford, MA, USA).

Ensuite, 12 ml de TSAYE ensemencés avec la souche et si nécessaire les deux solutions enzymatiques sont déposées sur une boite de Pétri. Les boites sont placés 15 min à 4°C puis séchées 45 min à 37°C. Une fois les boites séchées, un dépôt de poudre (10, 20, 30, 40, 50 ou 60 mg) est réalisé au centre de la boite. Pour permettre une bonne diffusion des composants, les boites sont placées une nuit à 4°C. Elles sont ensuite mises en culture à la température de croissance de la souche et le diamètre d'inhibition est relevé à 8h puis toutes les 24h.

III.4. METHODE DE SAUPOUDRAGE DES MICROBILLES

Les boites tests pour le saupoudrage sont réalisées selon le même protocole que précédemment. La poudre, constituée par les microbilles, n'est plus déposée au centre de la boite mais saupoudrée sur toute sa surface. La zone d'inhibition obtenue est mesurée en cm^2, par rapport de masse entre $1cm^2$ de papier et la masse de la zone d'inhibition observée.

IV. METHODES DE SECHAGE DES SOLUTIONS ENZYMATIQUES

IV.1. LYOPHILISATION

La lyophilisation est une technique de séchage par sublimation de l'eau contenue dans un matériau congelé sans en altérer la structure. La solution à lyophiliser est répartie en aliquotes de 10 ml dans des piluliers. L'ouverture est bouchée par un film transparent percé de trous pour permettre une bonne évaporation de l'eau lors de la sublimation. Les échantillons prêts sont congelés à –30°C puis lyophilisés dans un lyophilisateur Lyovac GT2E (Amsco / Finn aqua) à 2 bars et –45°C pendant deux jours entiers. Le troisième jour, le lyophilisat est broyé avec un vibro-broyeur planétaire à billes et mouvements oscillants MM 2000 (Retsch). Les billes en acier ont un diamètre de 6 mm ou 3 mm et une masse de respectivement 2g ou 0.43g. Une ou plusieurs billes sont placées dans chaque pilulier pour obtenir un broyage par impact et écrasement (Figure 35).

Le temps et la vitesse d'agitation des bras sont fonction de la distribution de taille souhaitée.

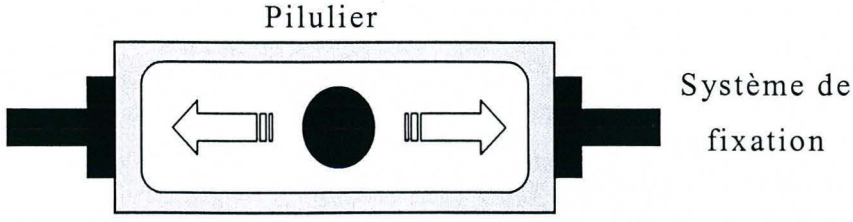


Figure 35: schéma des mouvements de va et vient de la bille à l'intérieur du pilulier permettant le broyage du lyophilisat.

Le nombre d'oscillations des fixations est d'environ 1550 tours/min. Mais, il est possible de régler la vitesse de rotation du moteur (0 à 100 %) et ainsi, l'intensité des vibrations des bras portant les piluliers

IV.2. ATOMISATION

L'atomisation des solutions est réalisée sur un atomiseur pilote Niro Minor (Niro, France) dans les installations de la société Colloids Naturals International (Rouen, France). La solution d'atomisation est préparée à température ambiante quelques heures avant le début du séchage afin de permettre un dégazage partiel.

Durant le séchage, la température d'entrée de l'air est de 170°C et la température de sortie 90°C. Une buse rotative est utilisée et le débit du produit est de 5 Hz (fréquence du moteur de la pompe).

IV.3. GRANULATION

La granulation est réalisée sur un granulateur GLATT WSG 5 (GLATT Pharmatech, Allemagne). La température d'entrée de l'air est de 70°C et le liant est pulvérisé par une pression d'air de 0.5 bar. Le glucose et une partie de la gomme acacia sont placés sous forme de poudre dans le granulateur.
Le thiocyanate et la gomme acacia restante sont mis en solution et pulvérisés sur le mélange glucose/gomme acacia de façon à former les agrégats.

V. PELLICULAGE EN LIT D'AIR FLUIDISE

Le pelliculage des enzymes sur les noyaux obtenus par atomisation, s'est déroulé dans le « Technology Training Center » de la société GLATT Pharmatech (Binzen, Allemagne).

V.1. PRINCIPE

Le pelliculage est réalisé sur un pelliculeur à lit d'air fluidisé pilote faisant intervenir la technologie Wurster. Les particules à enrober sont placées dans la chambre de pulvérisation. La solution d'enrobage est projetée en co-courant, à la base de la colonne directement dans le lit de particules.

Un batch se déroule en trois étapes :

- ✧ pulvérisation de la lactoperoxydase
- ✧ pulvérisation de la glucose oxydase
- ✧ séchage des microbilles

V.2. PROTOCOLE

Un pelliculeur pilote GPCG1 (GLATT) faisant intervenir le procédé Wurster est utilisé. Une buse de 1.2 mm, un plateau d'aération de type A, spécial poudre, et des filtres de 10 µm sont installés afin de bien fluidiser les particules de poudre. Différents pelliculages sont réalisés par batchs successifs de 500g. Les compositions finales des microbilles obtenues sont reportées dans les tableaux suivants pour les microbilles faisant intervenir un LPS « classique » et pour les compositions de LPS « substitué » (Tableau 17, Tableau 18). Les solutions enzymatiques sont préparées avec une solution saline à 0.9% pour la lactoperoxydase et du tampon phosphate 0.1 M, pH 6.4 pour la glucose oxydase.

Deux pelliculages secondaires sont aussi testés sur les microbilles codées 382. Le premier enrobage est constitué de gomme acacia et le second de carraghénane (Tableau 19).

Les conditions de pelliculage pour chaque composition sont résumées dans le Tableau 20. Les enrobages secondaires de gomme acacia et de carraghénane sont réalisés respectivement avec une température d'entrée de l'air de 40 et 50°C, une température du produit de 29 et 33°C, un débit de pulvérisation de 7 et 7.5 g/min et une étape de séchage à 50°C dans les deux cas.

	Codage	*$S_{50}E$*		*$S_{200}E$*	
		S50 + LPO + GOD		*S200 + LPO + GOD*	
	Unité	*(g)*	*(%)*	*(g)*	*(%)*
Composition	*glucose*	44.54	8.88	135.13	26.86
	KSCN	8.51	1.70	27.01	5.37
	GA	446.95	89.13	337.87	67.15
	LPO	1.30	0.26	3.00	0.60
	GOD	0.14	0.03	0.17	0.03

Tableau 17: composition des microbilles de LPS « classique »

	Codage	*$SI_{50}E$*		*$SI_{200}E$*	
		SI50 + LPO + GOD		*SI200 + LPO + GOD*	
	Unité	*(g)*	*(%)*	*(g)*	*(%)*
Composition	*glucose*	44.54	8.88	135.13	26.86
	KI	8.51	1.70	27.01	5.37
	GA	446.95	89.13	337.87	67.15
	LPO	1.30	0.26	3.00	0.60
	GOD	0.13	0.03	0.16	0.03

Tableau 18 : composition des microbilles de LPS « substitué »

	Codage	*$S_{200}EG$*		*$S_{200}EGC$*	
		$S_{200}E$ + gomme acacia		*$S_{200}EG$ + carraghénane*	
	Unité	*(g)*	*(%)*	*(g)*	*(%)*
Composition	*$S_{200}E$*	600	66.6	266	60
	GA	300	33.3	134	30
	Carraghénane	-	-	40	10

Tableau 19 : composition du pelliculage secondaire des microbilles de LPS « classique »

Codage	*$S_{50}E$*	*$S_{200}E$*	*$SI_{50}E$*	*$SI_{200}E$*
Lactoperoxydase				
T° entrée air	45	50	45	45
T° produit	26	30	31	28
Glucose oxydase				
T° entrée air	45	30	45	45
T° produit	26	26	26	27
Séchage				
T° entrée air	45	40	45	45
T° produit	29	28	29	29
Débit de pulvérisation (g/min)	7	7	7	7

Tableau 20: conditions expérimentales du pelliculage de la lactoperoxydase et de la glucose oxydase

RESULTATS & DISCUSSION

I. DEFINITION DES CONDITIONS D'ETUDE

L'objectif de ce travail est de mettre au point une formulation originale d'un système multienzymatique complet, enzymes et substrats, de façon à stabiliser son activité et faciliter son utilisation en industrie.

Pour cela la réalisation d'une formulation sèche formant une poudre a été décidée. Des microbilles contenant le système multienzymatique sont élaborées de façon à activer la réaction enzymatique par une solubilisation lors du contact avec la surface humide des aliments (Figure 36).

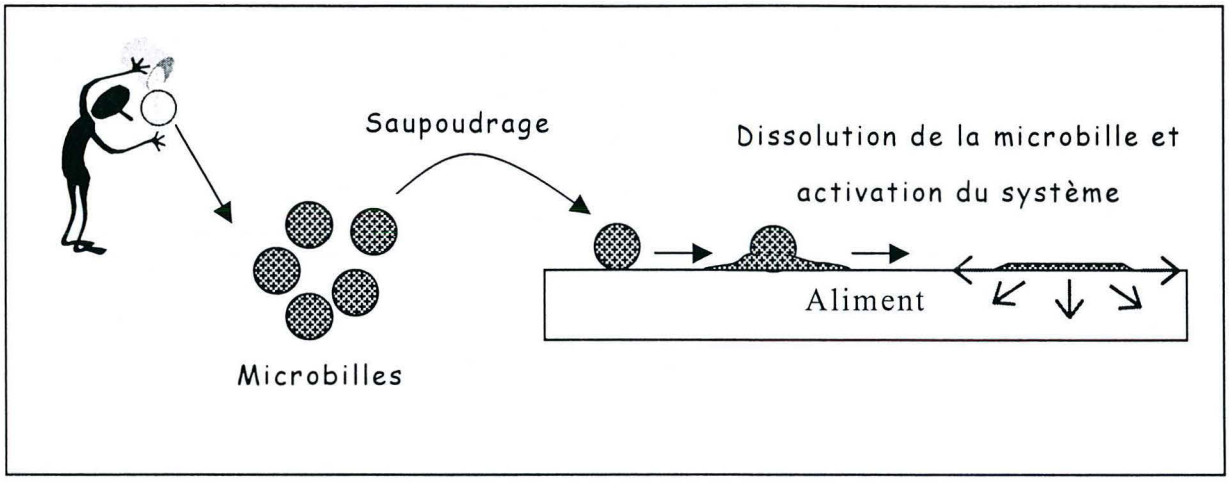


Figure 36 : schématisation du mode d'activation du système enzymatique

Le choix de la formulation arrêtée, notre attention s'est portée sur la détermination du modèle multienzymatique, l'organisation interne de la microbille et sur les techniques possibles pour son élaboration.

I.1. CHOIX DU MODELE

Les études préalablement réalisées dans l'équipe de microbiologie alimentaire du laboratoire nous ont encouragés à choisir, comme modèle, le système lactoperoxydase / thiocyanate / peroxyde d'hydrogène (LPS), faisant intervenir l'association glucose oxydase / glucose comme générateur d'H_2O_2.

Sa variante où le thiocyanate de potassium (KSCN) est substitué par de l'iodure de potassium (KI) a aussi été retenue car l'effet antibactérien obtenu avec I^- est plus marqué que celui obtenu avec SCN^- (Revol-Junelles *et al.*, 2001). De plus, la substitution de SCN^- par I^- permet de quantifier l'impact du thiocyanate sur la stabilité du système encapsulé et de tester la modularité de la microbille.

Enfin, un système témoin sans thiocyanate a été élaboré afin de quantifier l'effet antibactérien dû à la production de peroxyde d'hydrogène (Tableau 21). La comparaison des inhibitions obtenues avec le système complet et avec ce système témoin permettra de vérifier l'activation du LPS.

Noms et abréviations	***LPS « classique » S***	***LPS « substitué » SI***	***Témoin H_2O_2 SH***
Enzymes	LPO GOD	LPO GOD	LPO GOD
Substrats	D Glucose KSCN	D Glucose KI	D Glucose

Tableau 21 : systèmes multienzymatiques retenus comme modèles d'étude (LPO : lactoperoxydase, GOD : glucose oxydase)

I.2. CONFORMATION DE LA MICROBILLE

Les systèmes modèles sont composés de deux substrats et de deux enzymes. Quatre configurations peuvent être envisagées (Figure 37). Il est donc nécessaire de rechercher les avantages de chacune afin de choisir celle qui semble la plus appropriée.

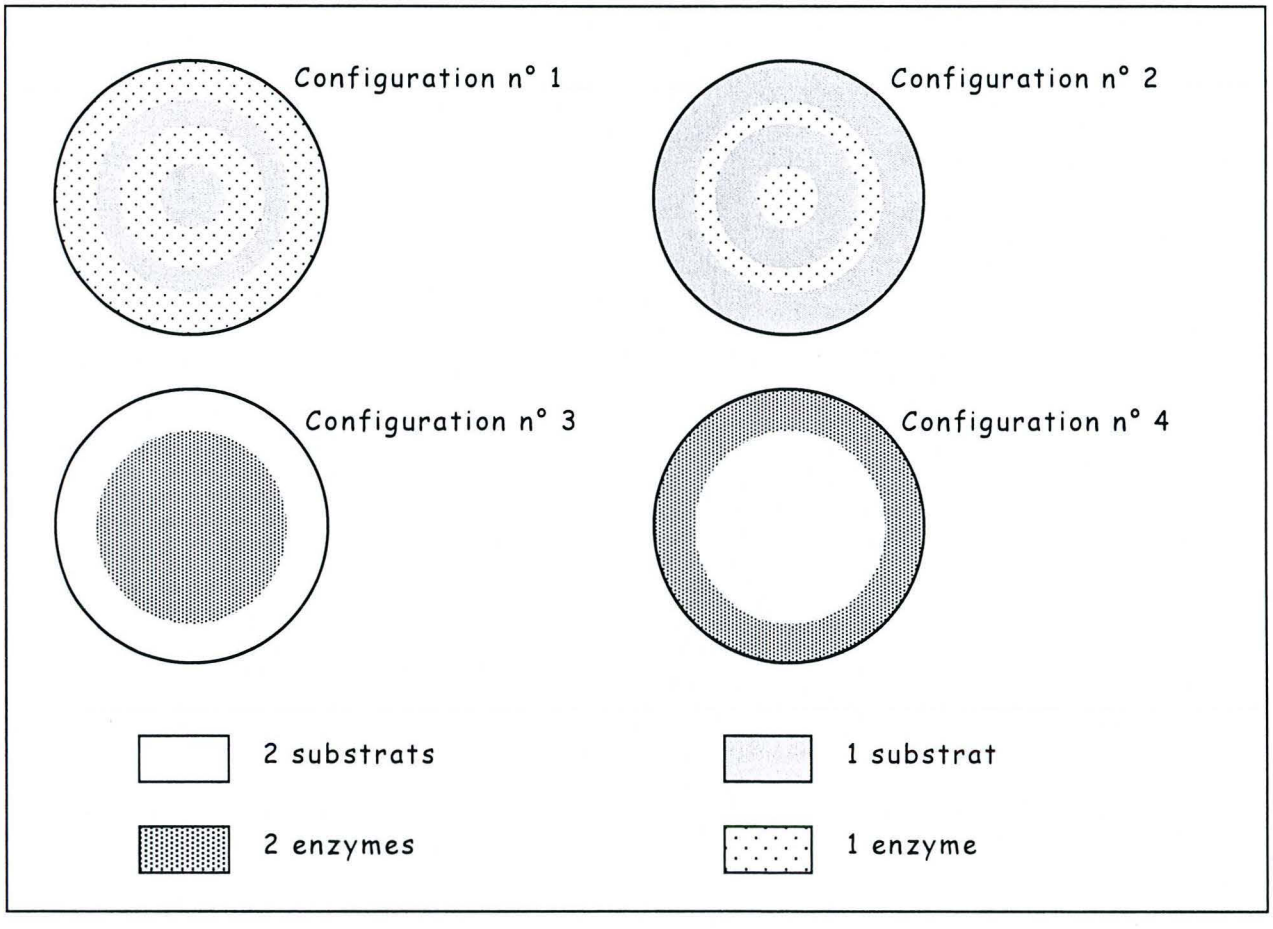


Figure 37: schéma récapitulatif des quatre configurations de billes possibles

La configuration n°1 correspond à une succession de couches substrats / enzymes. On peut imaginer, au centre le thiocyanate très hygroscopique, ensuite la LPO relativement thermorésistante, le glucose puis la glucose oxydase. Lors de la re-solubilisation de la microbille, le glucose et la glucose oxydase seront les premiers à être activés et le peroxyde d'hydrogène produit risque de migrer vers l'extérieur plutôt que d'aller activer la LPO. Il peut en résulter un accroissement de l'effet antibactérien dû à H_2O_2, ce qui n'est pas le but recherché.

Dans la configuration n°2, la conformation de la microbille est similaire à la précédente mais cette fois les enzymes sont au centre et les substrats à la périphérie. Se cumulent aux risques de migration de l'H_2O_2, des problèmes de diffusion. En effet, les substrats, plus petits que les enzymes, vont diffuser plus loin et plus rapidement. Une partie risque donc de se disperser dans le milieu sans interagir avec les enzymes et l'efficacité du système pourrait en être diminuée. De plus la présence de glucose en surface risque de fortement dégrader le comportement rhéologique de la poudre formée par les microbilles, car le glucose est une substance collante, difficile à stabiliser par séchage. La présence d'humidité dans l'air ambiant peut induire une réhydratation superficielle des microbilles et entraîner leur agglomération.

Pour la configuration n°3, les enzymes sont au centre et les substrats à la périphérie. Comme dans le cas précédent, un risque de pertes de substrats existe suite à leur diffusion dans le milieu. De plus, la glucose oxydase est une enzyme thermosensible, sa présence au cœur de la bille implique une succession de phases de chauffage lors de son pelliculage puis successivement celui du glucose et du thiocyanate. La perte d'activité de l'enzyme due au procédé de fabrication peut donc être plus importante que lorsque l'enzyme est pelliculée en dernier.

La configuration n°4 correspond à un noyau composé d'un mélange des deux substrats servant de base au pelliculage des deux enzymes. La réhydratation progressive de la bille va permettre la mise en contact des différents constituants. Les enzymes étant de plus grosses molécules que le glucose et le thiocyanate, leur diffusion lors de la re-solubilisation sera limitée. Le système sera donc facilement activé.

Cette dernière solution apparaît comme la plus acceptable. Elle implique la réalisation préalable d'un noyau utilisé comme base pour le pelliculage des enzymes.

La réalisation de la microbille se déroule donc en deux étapes :

✧ **l'élaboration du noyau sec** contenant différentes quantités de glucose et de thiocyanate ou iodure,

✧ **le pelliculage** de la lactoperoxydase et de la glucose oxydase autour du noyau obtenu.

I.3. REALISATION DU NOYAU SEC

Les premiers essais de déshydratation du mélange glucose / thiocyanate ont été un échec. La pâte obtenue est apparue comme impossible à stabiliser. L'ajout d'un polymère inerte servant de matrice a donc été décidé. En vue d'une utilisation du système en industrie agroalimentaire, le choix du polymère s'est fait dans le respect des contraintes législatives du domaine.

I.3.1. CHOIX DU POLYMERE

Le polymère retenu doit être d'origine naturelle, inerte vis-à-vis des souches bactériennes. Il doit limiter les transferts d'eau de façon à stabiliser la poudre tout en possédant un caractère hydrophile suffisant pour permettre la dissolution des microbilles lors du contact avec la surface à traiter. Parmi les nombreux polymères naturels existants, plusieurs sont préconisés pour une utilisation alimentaire. Ce sont principalement des polysaccharides comme l'alginate ou le carraghénane ou encore les gommes. La gomme acacia a retenu notre attention. Ce polysaccharide d'origine végétale remplit au mieux les conditions que nous nous sommes imposées.

En effet, la gomme acacia est un polymère naturel. Les solutions présentent une très faible viscosité en regard d'autres polysaccharides de même masse moléculaire (Sanchez *et al.*, 2000). Ainsi, les taux de matière sèche sont plus importants et les apports d'énergie nécessaires au séchage réduits. La gomme acacia possède d'excellentes propriétés filmogènes ce qui fait d'elle un bon agent d'encapsulation (Ré, 1998).

Sa capacité à former des films diminue le caractère exagérément hydrophile du produit et réduit les transferts de gaz et d'humidité (Berk & Dumoulin, 1996). Jusqu'à des concentrations de l'ordre de 55% la gomme est soluble dans l'eau froide. C'est une bonne barrière à l'oxygène évitant ainsi les risques d'oxydation (Ré, 1998). Elle est autorisée en alimentaire et référencée sous le code E414 au *Codex alimentarius* en tant qu'additif. Enfin, c'est une fibre soluble à faible valeur énergétique ce qui peut apporter une valeur ajoutée au produit final (Phillips, 1998). Ces différentes considérations nous ont amené à retenir la gomme acacia comme matrice inerte d'encapsulation. L'addition de ce polymère au glucose et au thiocyanate, implique une étape de mélange en milieu aqueux des trois constituants suivie d'une phase de séchage pour former le noyau sec.

I.3.2. CHOIX DES METHODES DE SECHAGE

Il existe plusieurs méthodes de séchage. En industrie la lyophilisation et l'atomisation sont les plus fréquemment rencontrées.

La lyophilisation est une méthode très respectueuse du produit. L'intérêt de son utilisation repose surtout sur une seconde étape de broyage du lyophilisat qui permet de calibrer la taille des noyaux obtenus. Cependant, son passage en industrie implique un gros investissement financier et le procédé en deux étapes reste défavorable à son application.

L'atomisation est plus facile à extrapoler à l'industrie. La granulométrie finale du produit est dépendante du type d'installation et du type de buse utilisé. Son coût est plus réduit, d'environ 6 fois par rapport à la lyophilisation (Ré, 1998). Les paramètres importants pour une bonne atomisation sont : une faible hygroscopicité du produit et une faible viscosité des solutions à sécher. Plus la substance retient l'eau, plus il sera nécessaire d'apporter de l'énergie pour obtenir un séchage satisfaisant et le temps de séchage en sera augmenté.

De même, une solution trop visqueuse risque d'être difficile à pulvériser et les risques de colmatage de l'installation sont accrus. Le prix de revient du produit final en sera de ce fait affecté.

La dernière méthode de séchage envisagée est **la granulation**. C'est une méthode de séchage et de formation de particules par agglomération de plus petites, suite à la pulvérisation d'un liant. Ce procédé fait intervenir la technologie de la pulvérisation et de la fluidisation (Mortenson & Houmand, 1975). Son intérêt est de pouvoir contrôler la taille des particules, mais les faibles températures de séchage impliquent des temps de résidence longs.

Le choix du procédé étant délicat sans expérimentation, les trois méthodes ont été expérimentées et la décision finale est prise après l'étude de l'impact de chacune des méthodes sur les propriétés des particules obtenues.

I.3.3. Compositions des solutions

La composition originale de la solution à sécher a été déterminée à partir des données microbiologiques obtenues lors de travaux préalables au laboratoire dans l'équipe de Microbiologie Alimentaire. Les concentrations en glucose et en thiocyanate sont respectivement 200 mg/l et 40 mg/l. La concentration de la gomme acacia a été arrêtée à 10%. Cette composition est appelée solution originale ou S_1 pour le LPS « classique » SI_1 pour le LPS « substitué » et SH_1 pour le témoin H_2O_2. Parallèlement, différentes fractions substrats/masse totale, entre 0.2 et 50%, sont testées en maintenant le rapport glucose/thiocyanate constant et égale à 5 (M&M).

La microbille dans sa forme finale est composée d'un noyau sec comprenant les substrats et d'un pelliculage contenant les enzymes. Deux enrobages supplémentaires à base de gomme acacia et de carraghénane sont réalisés afin de modifier les propriétés physico-chimiques et microbiologiques de la microbille (Figure 38).

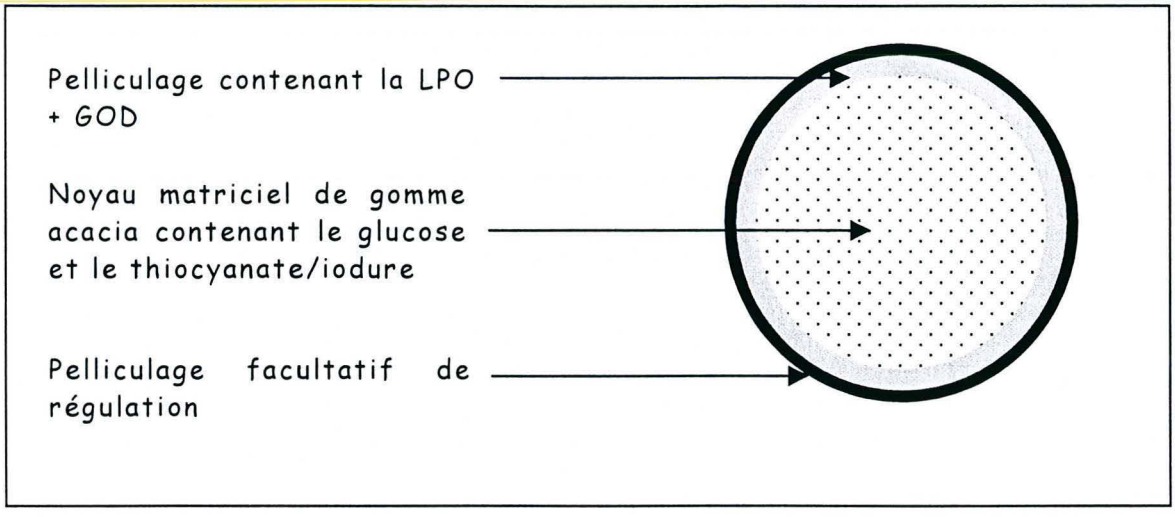
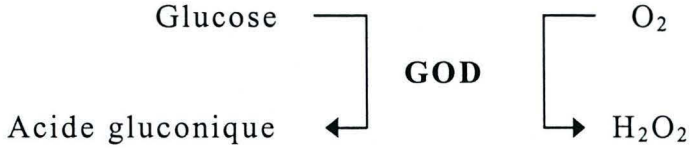


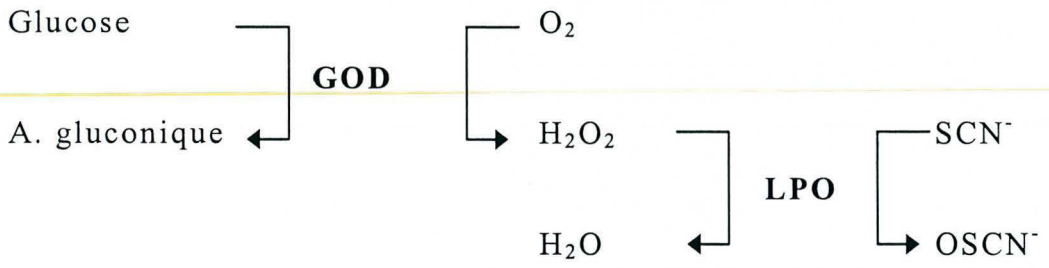
Figure 38: conformation de la microbille, LPO : lactoperoxydase, GOD : glucose oxydase

En résumé, 3 modèles d'études ont été retenus :

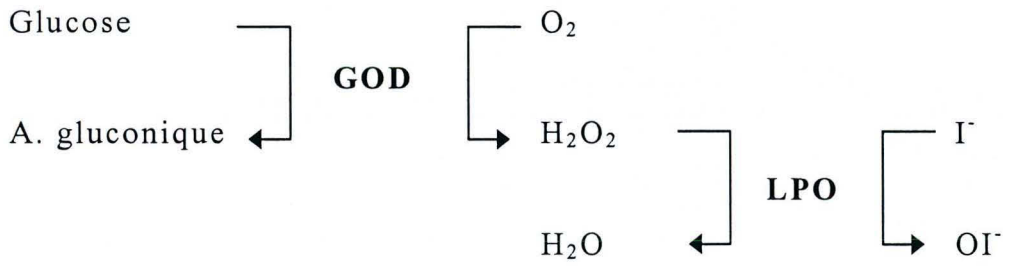
L'association glucose / glucose oxydase, **système enzymatique témoin** de l'activité antibactérienne d'H_2O_2, abrégé **SH,** (GOD : glucose oxydase) :



Le système lactoperoxydasique « classique » ou S faisant intervenir l'association glucose / glucose oxydase comme générateur d'H_2O_2, (GOD : glucose oxydase, LPO : lactoperoxydase, A. : acide) :



Le système lactoperoxydasique substitué ou SI dans lequel le thiocyanate est remplacé par de l'iodure de potassium (GOD : glucose oxydase, LPO : lactoperoxydase, A. : acide) :



Pour aider à la compréhension du déroulement de l'étude, des organigrammes ont été réalisés, reprenant les différentes étapes de la mise au point pour chacun des 3 systèmes multienzymatiques retenus. Ces organigrammes sont présentés sur la feuille libre jointe au manuscrit ainsi qu'en annexe du document (annexe 1).

II. EFFET DE LA METHODE DE SECHAGE SUR LES PROPRIETES DES NOYAUX SECS OBTENUS

Dans cette première partie, l'impact de la méthode de séchage sur les propriétés des noyaux est étudié, afin de déterminer la méthode de séchage la plus appropriée à la réalisation de noyaux secs qui seront ultérieurement pelliculés.

Pour ne pas multiplier les facteurs dans les expériences de caractérisation, l'étude des poudres formées par les noyaux est menée sur une composition intermédiaire, S_{200} (Tableau 22).

Produits	***Concentrations (g/l)***	***% masse totale***
Gomme acacia	100	67.6
Glucose	40	27
Thiocyanate	8	5.4
Fraction substrats / masse totale : 32.4 %		

Tableau 22 : composition chimique des poudres testées

La caractérisation des noyaux se fait tout d'abord au niveau de la particule par une observation globale des poudres au niveau macroscopique puis microscopique. Ensuite, une étude quantitative par analyse d'images est menée afin de définir la morphologie des particules. Dans la seconde partie, des expériences physico-chimiques sont réalisées au niveau de la poudre : humidité résiduelle, isothermes de sorption, analyse de la structure chimique de surface, étude de l'organisation de la structure chimique et enfin caractérisation du comportement rhéologique.

II.1. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE

La connaissance des distributions de taille et de forme des poudres est nécessaire. Ces propriétés vont, en effet, affecter le comportement des poudres par exemple lors de leur fluidisation pour le transport, la préparation de mélange ou encore durant le stockage (Kouadri-Henni & Benhassaine, 1999). De plus, la qualité du pelliculage des enzymes va dépendre de la morphologie et de la taille des particules utilisées comme support.

II.1.1. OBSERVATIONS MACRO ET MICROSCOPIQUE

L'aspect des poudres est étudié tout d'abord au niveau macroscopique puis au niveau microscopique afin de mettre en évidence l'impact de la méthode de séchage employée sur la morphologie des particules obtenues.

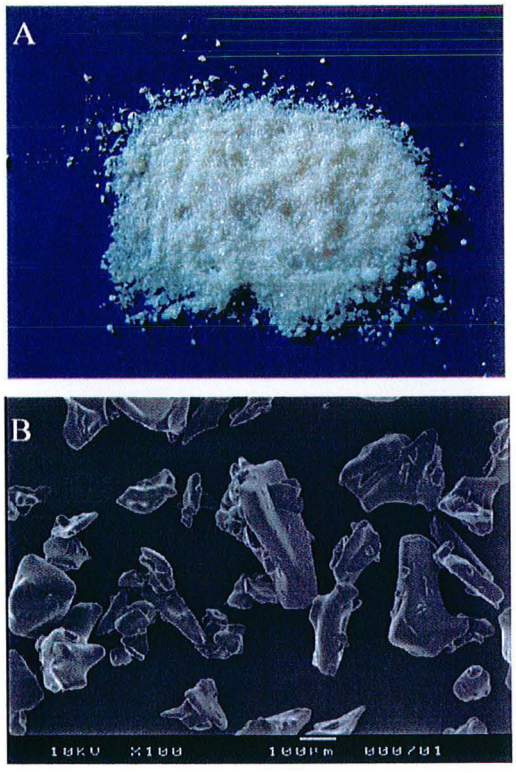


Figure 39 : observation macro (A) et microscopique (B) de la poudre lyophilisée

La poudre lyophilisée est légèrement jaunâtre, brillante par la présence de facettes sur les particules (Figure 39A). Sa structure semble être plutôt de type cristalline. Son écoulement paraît correct.

Les particules de lyophilisat sont très irrégulières, plutôt allongées et fortement anguleuses (Figure 39B). La distribution de taille semble large avec une absence de fines

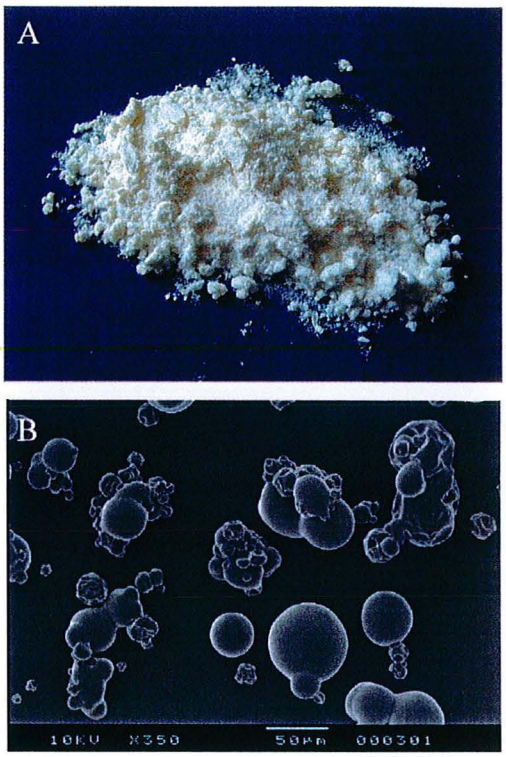


Figure 40 : observation macro (A) et microscopique (B) de la poudre atomisée

La poudre atomisée est blanchâtre, mate (Figure 40A). Les particules qui la constituent, semblent être de plus petite taille avec la présence de poussières. L'échantillon a tendance à motter ce qui peut traduire un écoulement peu satisfaisant.

Les particules atomisées sont plutôt sphériques. La présence de fines se confirme (Figure 40B). Les plus petites particules sont souvent agglomérées sur les plus grosses ce qui peut expliquer la tendance au mottage de la poudre.

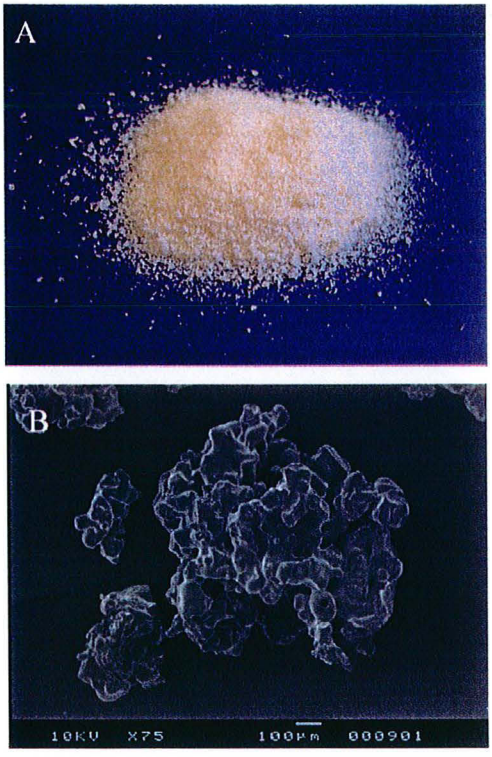


Figure 41 : observation macro (A) et microscopique (B) de la poudre granulée

La poudre granulée est jaunâtre (Figure 41A). Contrairement aux poudres obtenues avec les deux autres procédés, elle est constituée de particules de grande taille. Son écoulement semble fluide, sans mottage, mais lors de son stockage, des phénomènes de prise en masse apparaissent.

Les granules sont formés de particules agglomérées (Figure 41B). Ils sont de tailles importantes et faiblement sphériques. Leurs contours sont anguleux. La structure des particules est poreuse.

La morphologie des particules constitutives des poudres diffère en fonction de la méthode de séchage employée. L'observation macroscopique révèle des différences de taille et de forme de particules, de couleur et de texture L'observation par microscopie électronique à balayage vient corroborer les premières observations réalisées sur les poudres au niveau macroscopique.

II.1.2. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE QUANTITATIVE

Pour mieux quantifier les différences de morphologie des particules en fonction de la méthode de séchage employée, une analyse d'image a été réalisée. La poudre obtenue par granulation n'a pas pu être analysée par cette technique car elle est exclusivement constituée d'agglomérats de grosse taille qui rendent impossible l'étude des grains constitutifs. C'est pourquoi les résultats présentés ne reprennent que la caractérisation des poudres obtenues par lyophilisation et atomisation (Tableau 23).

	Circularité	***Fmax/Fmin***	***Fmax/Deq***	***Robustesse***	***PGC***
Lyophilisation	1.9 ± 2	1.8 ± 0.7	1.5 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Atomisation	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.07	0.03 ± 0.06
Cercle	*1*	*1*	*1*	*0.8*	*0*

Tableau 23 : descripteurs de forme calculés par analyse d'image, lyophilisation : 1568 particules analysées, atomisation : 1040 particules

Lors de l'analyse, 5 descripteurs sont calculés, la circularité, F_{max}/F_{min} et F_{max}/D_{eq}, la robustesse et l'indice de plus grande concavité (PGC). Les deux indices d'allongement, F_{max}/F_{min} et F_{max}/D_{eq}, caractérisent l'étalement de la silhouette dans les plans horizontaux et verticaux. La valeur de la robustesse renseigne aussi sur l'allongement des particules mais sans tenir compte de la forme globale, contrairement aux deux précédents, qui sont plus adaptés à l'étude de particules du type sphéroïdes.

Les particules analysées sont comparées à un cercle. Cette forme est caractérisée par une circularité et des indices d'allongement (F_{max}/F_{min} et F_{max}/D_{eq}) égaux à 1. La robustesse est égale à 0.8 et la concavité est nulle (Tableau 23). Plus une particule se rapproche d'un cercle plus ses descripteurs seront voisins de ces valeurs.

Les particules de lyophilisat sont anguleuses. Leur circularité est égale à 1.9 ce qui l'éloigne du cercle. Les indices d'élongation et de plus grande concavité (PGC) sont élevés, la robustesse faible ce qui traduit une morphologie de particule fortement irrégulière. Les écart-types des différents descripteurs sont élevés. Ce résultat met en relief la forte hétérogénéité de forme de la population (Tableau 23).

✧ **Les particules atomisées** sont sphériques. Leur circularité est égale à 1 et les indices d'élongation ont une valeur très proche de celle du disque. Elles sont convexes car leur indice de concavité est faible (PGC = 0.03). Les écart-types sont acceptables, ce qui permet de conclure à une répartition morphologique relativement homogène (Tableau 23).

II.1.3. Distribution de taille

La distribution de taille des trois types de particules est obtenue par granulométrie laser. Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 24.

	d_{10} (µm)	d_{50} (µm)	d_{90} (µm)	*Span*
Lyophilisation	26 ± 0.3	131 ± 2	450 ± 8	3.2
Atomisation	14 ± 0.5	37 ± 1	84 ± 1	1.8
Granulation	14 ± 0.5	55 ± 7	2289 ± 476	41

Tableau 24 : distributions granulométriques des poudres en fonction de la méthode de séchage employée

La distribution granulométrique est étudiée par référence aux valeurs de d_{10}, d_{50} et d_{90}. Ces trois données représentent la taille en dessous de laquelle se trouve 10, 50 et 90% de la population. La valeur du span traduit l'étalement de la distribution.

Les particules formant la poudre lyophilisée ont été obtenue après broyage du lyophilisat pendant 50s dans un broyeur à billes. La distribution de taille est très large (span = 3.22) avec un diamètre moyen en volume de 131 µm. Ces paramètres traduisent une forte hétérogénéité de taille de la population.

La poudre atomisée est constituée de petites particules dont le diamètre moyen est de 37 µm. Le span de la distribution est assez élevée ce qui correspond à une population hétérogène. La poudre compte une part importante de fines et de poussières identifiables sur le graphique de distribution granulométrique (Figure 42).

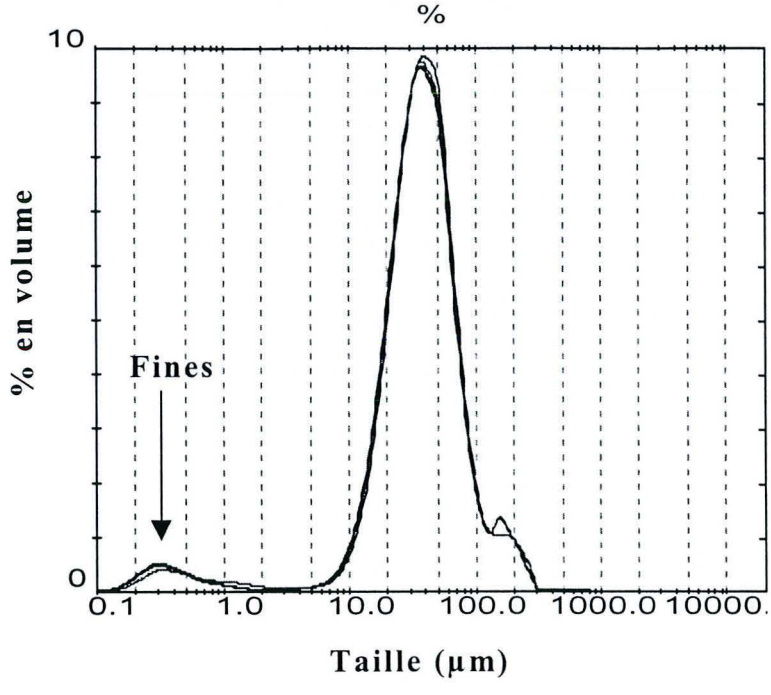


Figure 42 : distribution granulométrique par voie humide de la poudre atomisée

Les particules de la poudre obtenue par granulation sont de grande taille. Le d_{50} n'est pas très élevé (55 µm) mais la forte valeur de d_{90} démontre la présence de gros agglomérats qui viennent fausser les calculs de répartition granulométrique (Tableau 24).

En conclusion, cette première partie de l'étude morphologique des trois poudres a montré que :

✧ **La lyophilisation** conduit à la production de particules présentant une forte hétérogénéité de taille et de forme avec une morphologie très irrégulière.

✧ **L'atomisation** permet d'obtenir des particules sphériques avec une distribution de taille large et une présence importante de fines et de poussières.

✧ **La granulation** aboutit à la formation de particules agglomérées de grande taille. Leur morphologie est assez proche d'une sphère et leur structure poreuse.

II.2. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES POUDRES

II.2.1. HUMIDITE RESIDUELLE

Un faible taux d'humidité résiduelle est nécessaire pour éviter la formation de ponts liquides et donc l'agglomération d'une poudre durant son stockage. De plus la cohésion d'une poudre dépend, entre autre, de l'humidité. En effet, moins la poudre est humide, moins elle est cohésive et donc plus son écoulement sera bon (Teunou & Fitzpatrick, 2000). L'humidité résiduelle des poudres obtenues, en fonction de la méthode de séchage, est calculée par différence de masse avant et après une nuit à 110°C (Figure 43).

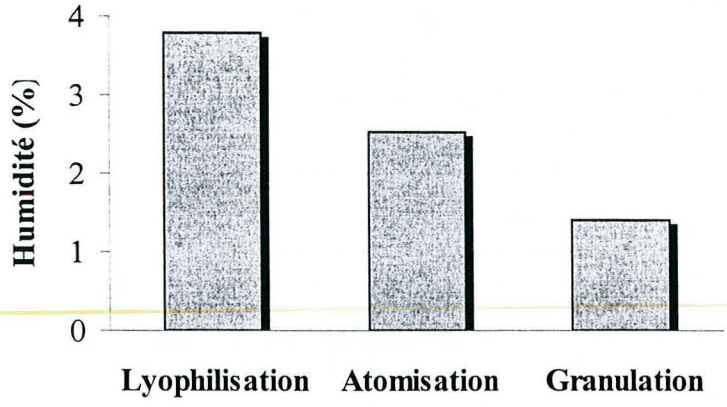


Figure 43 : humidité résiduelle des 3 poudres obtenues par lyophilisation, atomisation et granulation.

La poudre obtenue par lyophilisation présente le plus fort taux d'humidité résiduelle. L'atomisation et la granulation permettent d'obtenir des produits à très faible humidité résiduelle (Figure 43). Toutefois, ces taux d'humidité résiduelle sont tout à fait acceptables pour une application industrielle.

II.2.2. ISOTHERMES DE SORPTION

La réalisation des isothermes de sorption permet de comparer les caractères hygroscopiques des constituants. Pour une même activité de l'eau (a_w), un composé hygroscopique présente une teneur en eau supérieure à celle d'un composé simplement hydrophile.

Tout d'abord, l'influence du type de méthode de séchage employé est étudiée sur une composition de microbille unique. Puis, l'incidence de cette composition, principalement du taux de substrats encapsulés, est recherchée afin de valider le choix de la gomme acacia comme polymère matriciel.

– *INFLUENCE DE LA METHODE DE SECHAGE*

Les courbes de sorption des trois poudres sont similaires (Figure 44). La méthode de séchage n'a pas d'impact sur le comportement hydrophile des poudres.

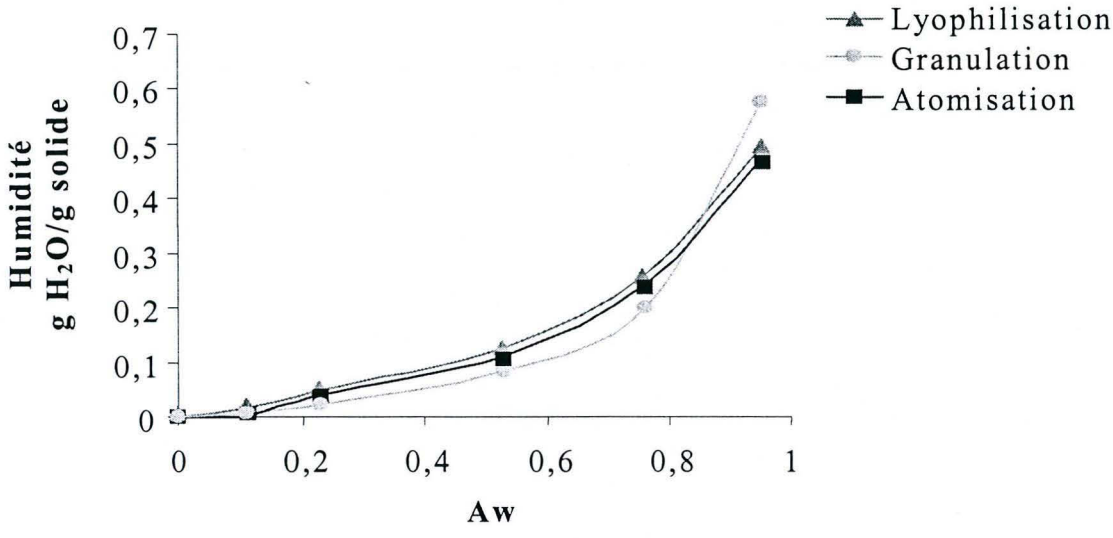


Figure 44 : isothermes de sorption des poudres obtenues par lyophilisation, granulation et atomisation

– *INFLUENCE DE LA COMPOSITION*

L'impact de la méthode de séchage étant négligeable, l'isotherme de la poudre atomisée est retenue comme représentant des trois méthodes. Il est comparé aux isothermes des produits bruts afin de rechercher le composé dont l'influence est la plus marquée (Figure 45).

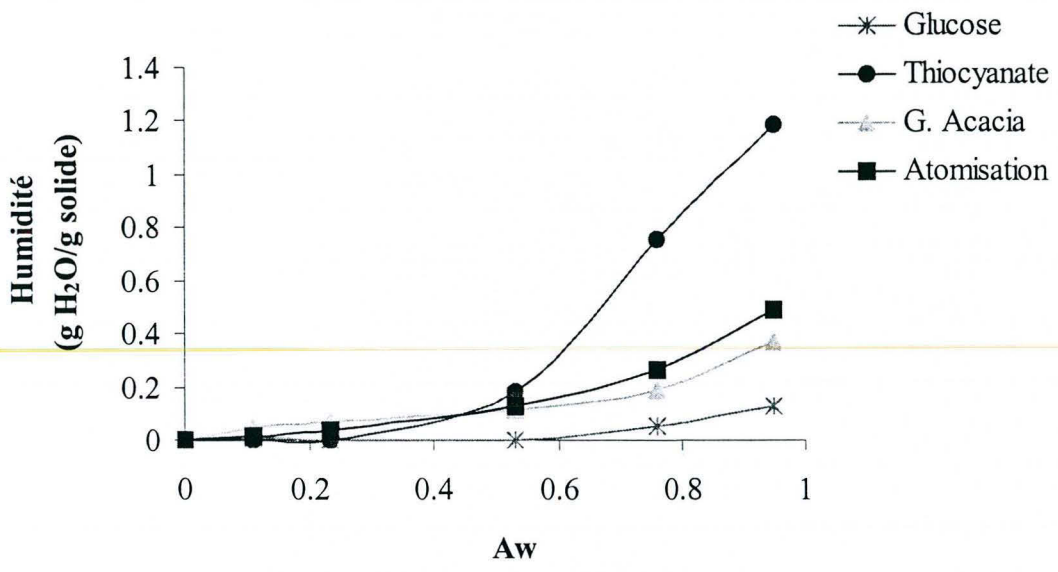


Figure 45 : isothermes de sorption des produits bruts et de la poudre

Le thiocyanate est le constituant le plus hygroscopique. La poudre, réalisée par atomisation du mélange de ces 3 constituants, présente un comportement très similaire à celui de la gomme acacia pure (Figure 45).

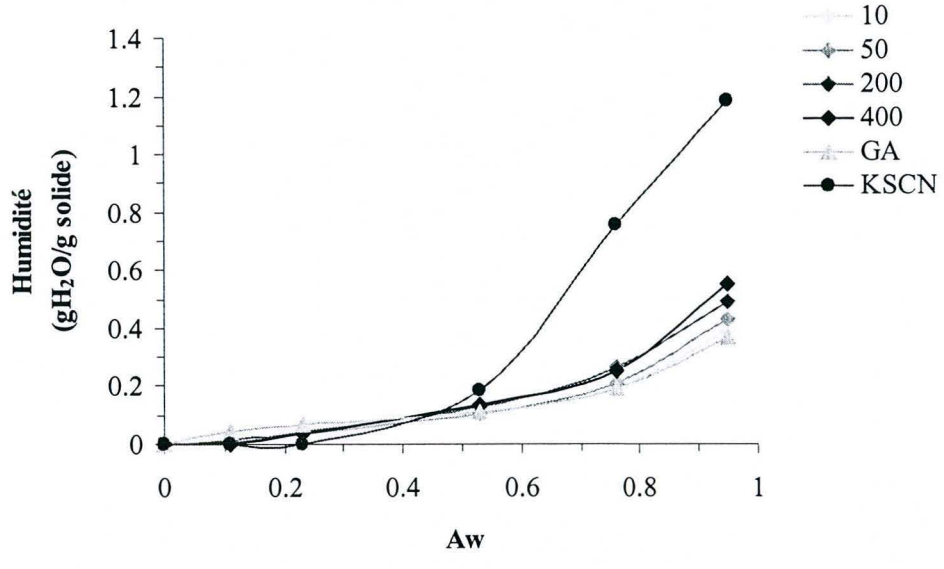


Figure 46 : isothermes de sorption de poudres contenant des quantités croissantes de thiocyanate et de glucose (10, 20, 50, 200, 400 fois les concentrations originales, GA : gomme acacia)

Lorsque les quantités de glucose et de thiocyanate augmentent, la poudre conserve un comportement comparable à celui de la gomme acacia seule (Figure 46). A 400 fois les concentrations originales, la fraction de substrats encapsulés est d'environ 50%. Or, l'influence de ces quantités importantes de glucose et de thiocyanate n'est sensible que pour les très fortes a_w (>0.8). Il apparaît donc que la gomme acacia permet de contrôler efficacement le caractère exagérément hydrophile du thiocyanate. Son choix est donc intéressant pour une utilisation avec des composés à forte hygroscopicité.

II.3. ANALYSE DE SURFACE PAR SPECTROMETRIE INFRAROUGE

La spectrométrie infrarouge par réflexion diffuse renseigne sur la nature des groupements chimiques présents à la surface des particules. La comparaison des spectres des produits bruts à ceux des poudres obtenues avec chacune des 3 méthodes de séchage permet d'identifier le composant majoritaire de la surface de la microbille.

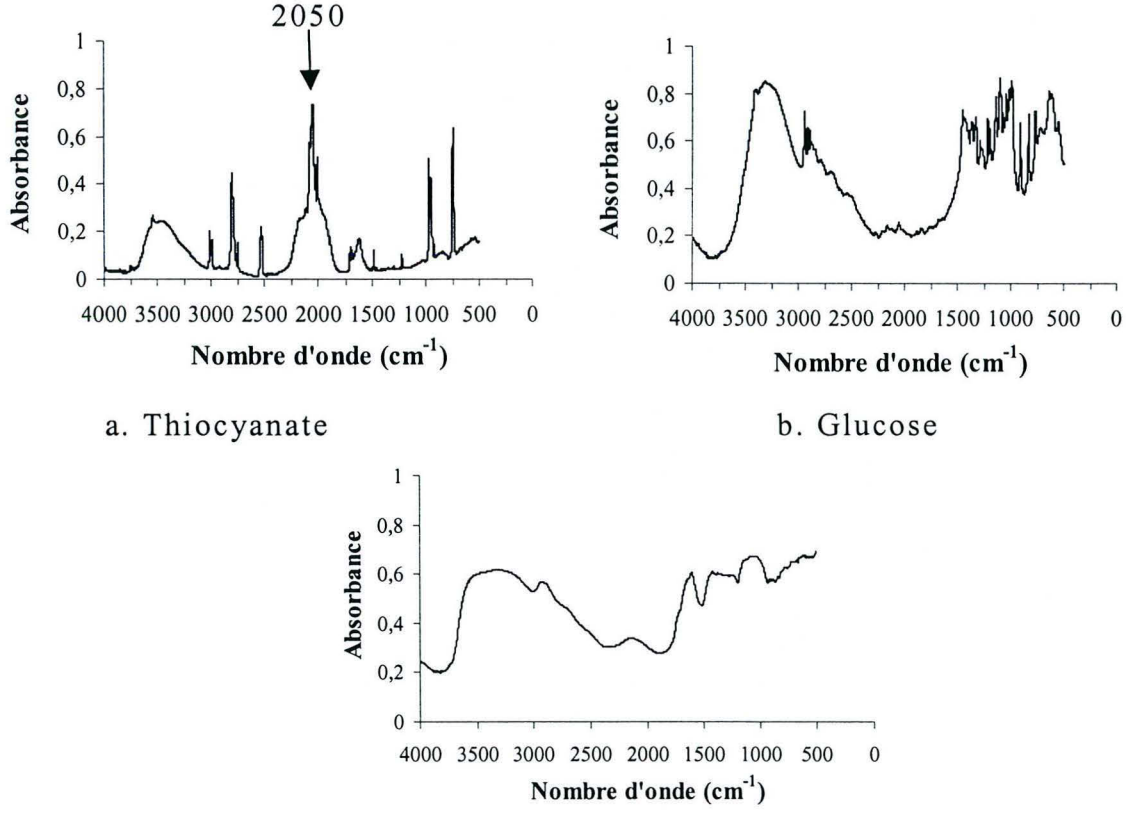


Figure 47 : spectres RDITF (Réflexion Diffuse Infrarouge à Transformé de Fourier) du thiocyanate (a), du glucose (b) et de la gomme acacia (c)

Le spectre infrarouge du thiocyanate est caractérisé par un pic bien défini à 2050 cm^{-1}. Celui du glucose présente le profil classique d'un sucre, très édenté et riche, avec des bandes à 1000–1200 cm^{-1} correspondant aux vibrations des liaisons O=C=C et à 3000-3600 cm^{-1} pour les vibrations des groupements OH. La gomme est un polysaccharide possédant une fraction protéique, son profil est donc moins bien défini qu'un sucre et les vibration des fonctions amide des protéines (1680-1480 cm^{-1}) sont présentes (Figure 47).

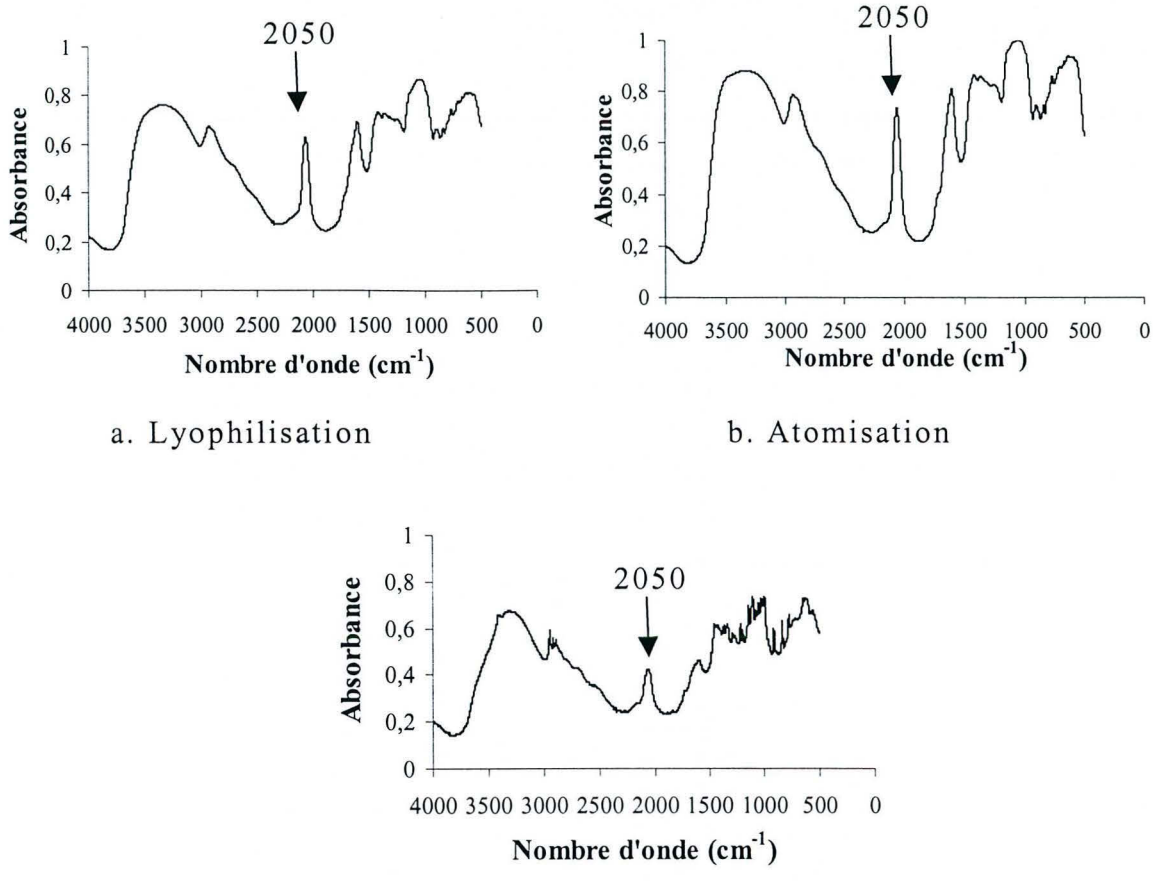


Figure 48 : spectres RDITF (Réflexion Diffuse Infrarouge à Transformé de Fourier) de la poudre obtenue par : lyophilisation (a), atomisation (b) et granulation (c)

Dans chacune des trois poudres, le thiocyanate est visualisable grâce à son pic caractéristique à 2050 cm^{-1} (Figure 48).

Les profils des spectres des poudres lyophilisée et atomisée sont tout à fait similaires, elles présentent donc les mêmes fonctionnalités chimiques. Le spectre obtenu pour la poudre granulée est différent (Figure 48a, b, c).

La comparaison avec les spectres des produits bruts, montre que les spectres de la poudre atomisée et de la poudre lyophilisée sont semblables à celui de la gomme acacia seule (Figure 48a, b et Figure 47c). La gomme est donc le composé majoritaire présent à la surface des particules. Ce résultat atteste d'une bonne encapsulation des substrats dans la matrice de gomme.

Sur les spectres des poudres atomisée et lyophilisée, les bandes 841, 772 et 645 cm^{-1} (Figure 48a, b) sont plus marquées que sur celui de la gomme acacia seule (Figure 47c). Ces différences mettent en évidence la présence de glucose. Pour confirmer ces différences, il est possible de calculer l'intensité relative de ces bandes par rapport à une bande inchangée sur le spectre de la gomme, le pic à 1074 cm^{-1} (Tableau 25).

Intensité relative	I_{1074}/I_{841}	I_{1074}/I_{772}	I_{1074}/I_{645}
Lyophilisation	7	6	19
Atomisation	4.3	3.7	8.7
Gomme acacia	*9*	*9*	

Tableau 25 : comparaison des intensités relatives des pics caractéristiques du glucose sur les spectres DRIFT des poudres lyophilisée et atomisée par rapport à la gomme acacia

L'intensité relative des trois pics est inférieure pour la lyophilisation et l'atomisation à celles calculées pour la gomme acacia (Tableau 25). Cette baisse d'intensité relative équivaut à une augmentation de I_{841}, I_{772} et I_{645} due à la contribution apportée par le glucose. Le glucose est donc visualisable sur les deux spectres des poudres lyophilisée et atomisée.

Toutefois, dans le noyau, le glucose correspond à 27% de la masse totale (Tableau 22). Son influence sur les spectres est donc négligeable comparée à la quantité présente dans la particule. Pour comparaison, le thiocyanate qui ne correspond qu'à 5,4% de la masse totale est nettement plus visible que le glucose.

La méthode de réflexion diffuse est une méthode faiblement invasive. Lorsque le rayon infrarouge frappe les particules, il ne pénètre pas au cœur de la particule mais seulement de quelques microns. Les faibles traces de glucose observées en périphérie supposent que la majorité se trouve concentrée dans le centre de la particule. Des hypothèses sur l'organisation interne des particules sont donc possibles (Figure 49).

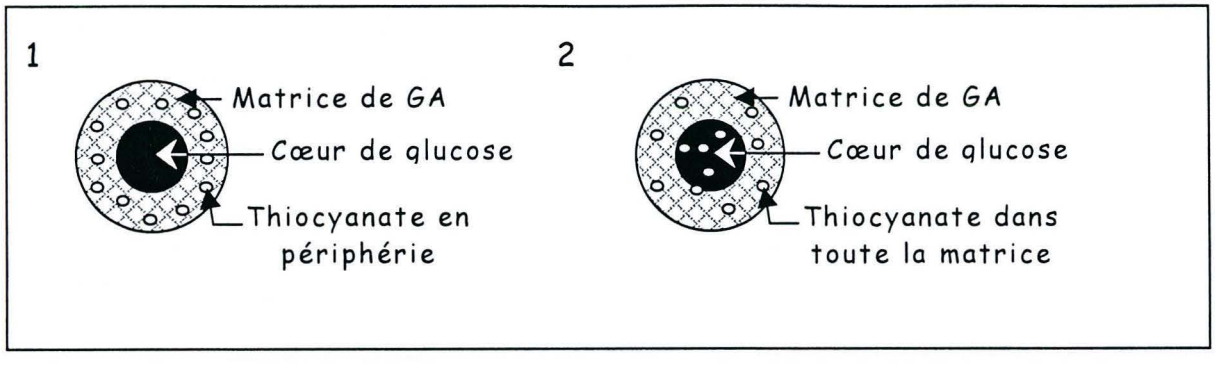


Figure 49 : hypothèses d'organisation interne des particules lyophilisée ou atomisée

La faible teneur en glucose de la périphérie est en faveur d'un cœur concentré en glucose. Mais la forte intensité du pic correspondant au thiocyanate ne permet pas de conclure sur sa répartition. Avec ces informations, il est impossible de trancher entre une concentration de KSCN à la périphérie ou une répartition homogène dans toute la matrice de gomme et dans le cœur (Figure 49). Cependant, les résultats des cinétiques de dissolution, présentés dans la suite du manuscrit, montrent qu'environ 10% de KSCN est libéré immédiatement pour la poudre atomisée et 50% pour la poudre lyophilisée.

Ces proportions représentent les quantités de thiocyanate présentes à la périphérie des particules. Elles sont donc en faveur d'une distribution homogène du thiocyanate dans la matrice de gomme acacia. La seconde hypothèse est donc la plus représentative de l'organisation interne des noyaux obtenus par atomisation et lyophilisation (Figure 49).

La poudre obtenue par granulation présente, au contraire des deux autres, un spectre similaire à celui du glucose (Figure 48c et Figure 47b). Avec ce procédé de séchage, il y a donc une faible encapsulation matricielle des substrats. De plus, la présence d'une grande partie du glucose en surface peut être un frein à l'écoulement de la poudre car le glucose est une substance collante. Ce résultat permet en outre, d'expliquer les phénomènes de prise en masse observés durant le stockage.

II.4. ANALYSE DE LA STRUCTURE ATOMIQUE PAR RAYONS X

L'observation macro et microscopique des poudres laisse penser que la poudre lyophilisée a une structure cristalline (II.1.1). Pour vérifier ce résultat, une analyse de la structure chimique aux rayons X est réalisée. Les spectres des trois poudres sont présentés ci-après (Figure 50 et Figure 51).

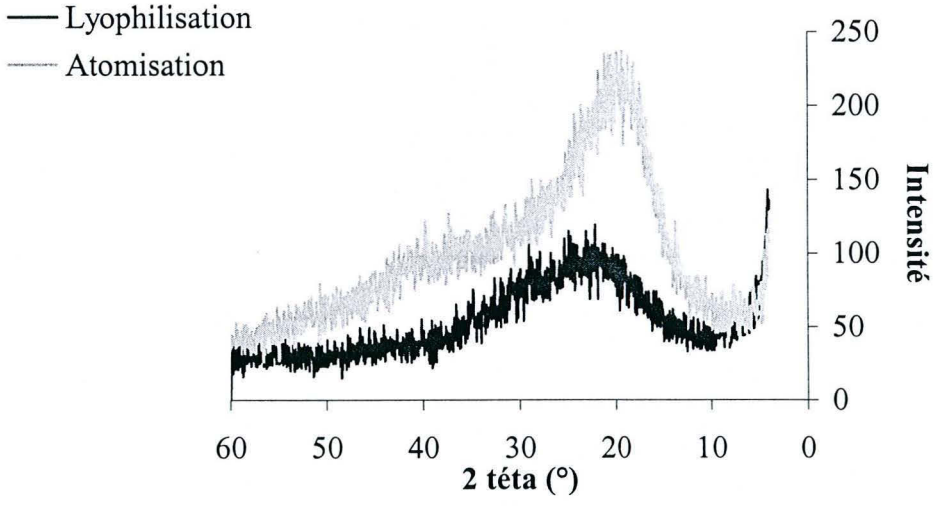


Figure 50 : spectres rayons X de la poudre lyophilisée et de la poudre atomisée

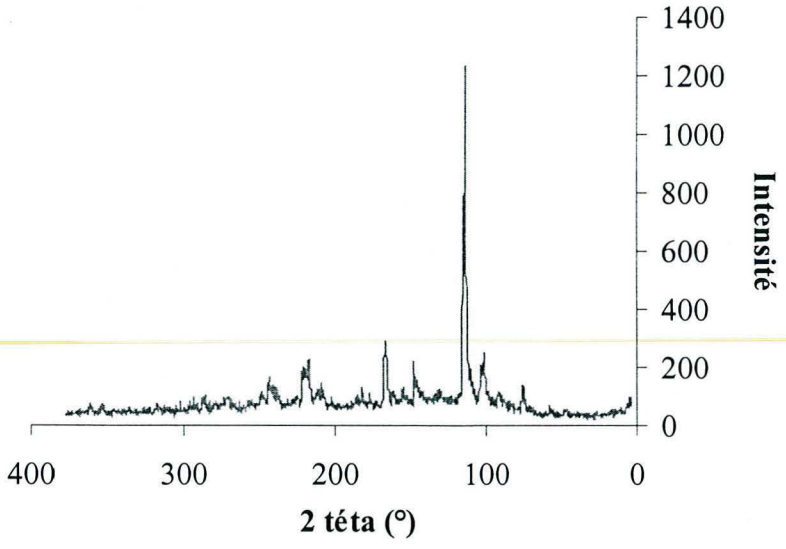


Figure 51 : spectres rayons X de la poudre granulée

Les spectres des poudres lyophilisée et atomisée sont similaires, attestant d'une structure amorphe (Figure 50). Contrairement à ce que l'observation de la poudre obtenue par lyophilisation nous laissait penser, elle n'est pas constituée de cristaux.

Cependant, la poudre obtenue par granulation présente un spectre caractéristique d'une structure cristalline (Figure 51). Ce résultat inattendu est directement lié à la méthode. En effet, lors de la granulation, le glucose est ajouté sous forme sèche. Il n'y a pas de création de particule mais agglomération de particules préformées. C'est donc la structure cristalline du glucose qui réapparaît dans le spectre. Pour les deux autres méthodes, les produits bruts sont solubilisés avant d'être séchés, ils perdent donc leur structure organisée et la procédure de séchage employée ne permet pas de re-cristallisation.

La structure chimique intervient principalement sur la solubilité. Un composé amorphe est plus soluble qu'un composé cristallin. Au contraire, une structure cristalline est souvent plus dense que la structure amorphe car les arrangements cristallins minimisent les vides. De façon générale, une structure amorphe présente toujours une isotropie des propriétés alors qu'un cristal peut avoir des propriétés différentes liées à son arrangement chimique interne.

II.5. CINETIQUES DE DISSOLUTION DES POUDRES

Les courbes de dissolution des trois poudres ont été réalisées afin de mettre en évidence les différences de structure des noyaux. Un volume d'eau constant est ajoutée à 500mg de poudre. Des prélèvements sont effectués au cours du temps sur lesquels la concentration en thiocyanate dissout est mesurée.

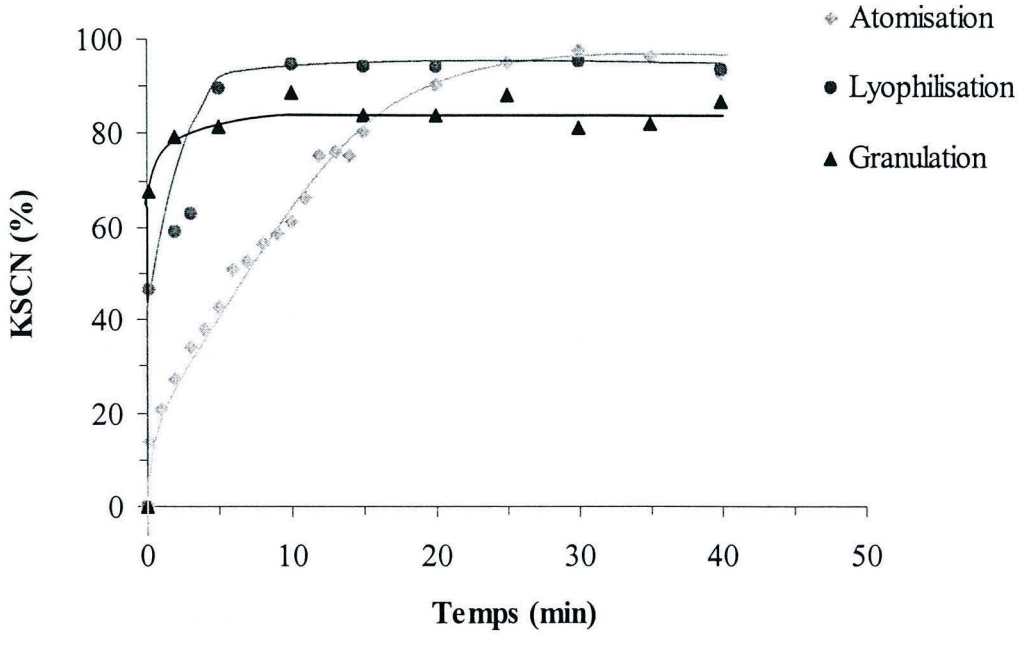


Figure 52 : suivi de la libération du thiocyanate à partir des noyaux secs en fonction de la méthode de production employée

Dès sa mise en contact avec l'eau, la poudre granulée libère la quasi totalité du thiocyanate qu'elle contient (Figure 52). Après 40 min, alors que la poudre est entièrement dissoute, la concentration en thiocyanate mesurée n'atteint toujours pas la concentration théorique. Une partie du thiocyanate a donc été perdue lors de la granulation.

La poudre lyophilisée libère immédiatement 50% du thiocyanate (Figure 52). Ensuite la vitesse de libération diminue, pour aboutir à 100% du thiocyanate libéré en moins de dix minutes. La poudre atomisée présente la vitesse de dissolution la plus faible. Lors des 15 premières minutes, le thiocyanate est libéré progressivement au cours du temps à une vitesse de 23 mg/l/min. Progressivement, la vitesse ralentie et la totalité de KSCN passe en solution après 30 min (Figure 52).

Ces différences de vitesse de dissolution sont liées, en partie, à la différence de porosité des particules. La poudre obtenue par granulation est formée par agglomération de petites particules. De nombreuses poches d'air sont créées lors de cette phase d'agglomération. De même, la lyophilisation est précédée d'une phase de congélation durant laquelle des cristaux de glace se forment. Lors de la sublimation, ces cristaux laissent place à des cavités qui vont induire une porosité importante (Kind, 1999). L'eau pénètre donc rapidement à l'intérieur des particules pour les dissoudre.

Les particules de poudre atomisée sont constituées d'une coque plus ou moins rigide selon la température de séchage (Ré, 1998). Cette enveloppe doit donc se dissoudre avant que l'eau puisse atteindre le cœur de la particule et libérer son contenu. Environ 10% du thiocyanate est libéré instantanément (Figure 52). Cette fraction correspond à la quantité de KSCN présente à la périphérie de la particule. Environ 90% de KSCN est donc bien encapsulé à l'intérieur de la particule. Ce résultat est donc favorable à une organisation interne des particules proche de la configuration n°2 (Figure 49) où le thiocyanate est réparti de façon homogène dans toute la masse.

En conclusion, l'analyse des propriétés physico-chimiques des trois poudres a montré que :

✧ Les trois méthodes de séchage conduisent à la réalisation de poudres à **faible humidité résiduelle**.

✧ L'encapsulation des substrats dans la gomme acacia permet de **contrôler le caractère hygroscopique** du thiocyanate.

✧ La lyophilisation et l'atomisation permettent une **bonne encapsulation matricielle** des substrats, au contraire de la granulation qui présente une capacité d'encapsulation matricielle plus faible. Sur les particules granulées, le glucose se retrouve principalement en surface induisant un risque d'agglomération.

✧ Les poudres lyophilisée et atomisée ont **une structure amorphe**. La poudre granulée a **une structure cristalline** due à la présence de glucose non préalablement solubilisé.

✧ La méthode de séchage employée influence la **vitesse de dissolution** des noyaux. Ce paramètre peut être primordial dans la suite de l'étude car en choisissant la méthode de production, il serait possible de modifier la vitesse de libération des substrats et par conséquent contrôler l'activité antibactérienne de la microbille.

La dernière partie de l'étude de l'impact de la méthode de séchage sur les propriétés des poudres formées repose sur la caractérisation de leur écoulement.

III. CARACTERISATION RHEOLOGIQUE DES POUDRES

III.1. DETERMINATION DES INDICES DE « FLOWABILITY » ET « FLOODABILITY »

Les propriétés d'écoulement des poudres obtenues par atomisation, lyophilisation et granulation sont déterminées grâce au testeur de poudre « Micro Powder Tester Hosokawa ». Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6.

		Lyophilisation	*Atomisation*	*Granulation*
Angle de repos	Deg.	48.5	51.2	47.3
Compressibilité	%	36.8	41.3	4.8
Angle de spatule	Deg.	57.4	57.2	45.1
Cohésion	%	39.3	23.8	77.6
Indice de « Flowability »		***40***	***42***	***81.5***
Angle de chute	Deg.	38.9	34.6	40.5
A. de différence	Deg.	9.6	16.6	6.8
Dispersibilité	%	6.2	44.8	6.1
Indice de « floodability »		***48***	***72***	***51.75***

Tableau 26 : caractérisation des propriétés d'écoulement des poudres obtenues par lyophilisation, atomisation et granulation par détermination de leurs indices de « flowability » et « floodability »

Les poudres atomisée et lyophilisée ont des propriétés d'écoulement analogues. Leurs indices de « flowability » sont équivalents, 40 et 42 (Tableau 26).

En référence aux tableaux d'analyse réalisés par Carr (M&M, Tab.5), ces indices sont représentatifs d'une poudre aux propriétés médiocres. Leur application en industrie nécessiterait des aménagements d'installations comme l'ajout de vibreurs ou d'agitateurs. Elles présentent des valeurs d'angles de repos, de spatule et de chute similaires (Tableau 26). Ces valeurs sont relativement élevées, ce qui est aussi caractéristique d'un mauvais écoulement. Elles dépendent principalement de la fluidité des poudres et de l'uniformité de taille et de forme. La poudre lyophilisée est moins compressible et moins dense que la poudre atomisée mais elle est plus cohésive, probablement à cause de la forme irrégulière des particules qui limite les mouvements individuels.

Par contre, les indices de « floodability », des deux poudres, sont significativement différents, respectivement de 48 et 72 pour les poudres lyophilisée et atomisée (Tableau 26). La poudre atomisée est très dispersible et fusante. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment, car les particules atomisées sont sphériques, avec une part de poussières non négligeable qui favorise la fluidisation naturelle de la poudre. Une partie de ces fines s'agglomère sur les particules plus grosses comme l'ont mis en évidence les observations macro et microscopiques (II.1.1). Ces phénomènes d'agglomération réduisent la mobilité individuelle des particules et donc l'écoulement global de la poudre (Teunou & Fitzpatrick, 2000).

La poudre obtenue par granulation a un comportement très différent des deux autres. Son écoulement est bon avec un indice de « flowability » élevé et un indice de « floodability » modéré (Tableau 26). Elle se caractérise surtout par une très faible compressibilité. En effet, elle est plus dense que les deux autres mais ne se tasse pas. Cette plus forte densité, pour une composition similaire, peut être corrélée à la présence de structure cristalline dans la poudre granulée et non dans les deux autres types de poudres. Les bonnes propriétés d'écoulement de cette poudre sont probablement liées à une taille moyenne plus importante. En effet, l'augmentation de la taille des particules surtout au-delà de 100µm, améliore considérablement les écoulements (Wong, 2000).

La valeur très élevée de la cohésion, pour la poudre granulée, rappelle les problèmes d'agglomération des particules dus au glucose présent en surface. Mais cette valeur n'est pas parfaitement représentative de la cohésion réelle de la poudre. Une partie non négligeable des particules reste bloquée sur le premier tamis dont la maille est trop petite. En effet, la détermination de la cohésion de la poudre par le Testeur Hosokawa décrite dans le chapitre M&M, implique l'utilisation de tamis de taille imposée sans tenir compte de la répartition granulométrique de la poudre. C'est pourquoi, il est préférable d'utiliser un autre indicateur de cohésion, le ratio d'Hausner. Ce rapport de densité est un bon indicateur de la cohésion et donc des propriétés d'écoulements d'une poudre (Geldart *et al.*, 1984, Wong, 2000).

III.2. Calcul des ratios d'Hausner

Il est possible d'apprécier les propriétés d'écoulement d'une poudre par le calcul du ratio d'Hausner (Hausner, 1967). Cette variable, abrégée RH, correspond à la valeur du rapport de la densité tassée sur la densité aérée :

$$\mathrm{RH} = \frac{d_{tassée}}{d_{aérée}}$$

Une classification des propriétés d'écoulement des poudres a été établie par Geldart à partir du calcul de ce ratio (Geldart *et al.*, 1984).

- ✧ **RH<1.25, poudres de classe A** : bon écoulement
- ✧ **1.25 <RH<1.4, poudres de classe AC** : comportement intermédiaire
- ✧ **RH >1.4, poudres de classe C** : mauvais écoulement

Les travaux de Hausner (1967) portaient sur la comparaison des densités des particules en fonction de leur morphologie : sphérique, irrégulière ou en paillette. Il est ressorti que plus la particule s'éloigne du cercle, plus le ratio d'Hausner est élevé et donc plus les propriétés d'écoulement sont mauvaises.

A partir des valeurs de densités aérées et tassées obtenues avec le testeur de poudre Hosokawa, les ratios d'Hausner des poudres lyophilisée, atomisée et granulée sont calculés (Tableau 27).

		Lyophilisation	*Atomisation*	*Granulation*
Densité aérée	(g/cc)	0.273	0.478	0.561
Densité tassée	(g/cc)	0.432	0.814	0.589
Ratio Hausner		***1.58***	***1.70***	***1.04***

Tableau 27 : détermination du ratio d'Hausner à partir des valeurs de densités aérées et tassées des différentes poudres

Selon la classification de Geldart, les poudres lyophilisée et atomisée appartiennent à la catégorie C, car leurs ratios sont supérieurs à 1.4. Leur écoulement est donc mauvais. Par contre, la poudre obtenue par granulation entre dans la catégorie A (Tableau 27). Elle présente donc de bonnes propriétés d'écoulement. Ces résultats sont en accord avec la grille d'évaluation établie par Carr (1965).

La densité aérée de la poudre lyophilisée est faible, comparée aux deux autres poudres. Cette poudre est principalement constituée de particules anguleuses et fortement irrégulières. Les frictions entre les particules sont importantes. C'est pourquoi, il n'y a pas d'écroulement de la poudre et d'organisation des particules les unes par rapport aux autres. De nombreux vides persistent, diminuant la valeur de la densité aérée (Abdullah & Geldart, 1999).

La poudre atomisée est, au contraire, constituée de particules très proches, morphologiquement, de la sphère (Tableau 23). Les frictions entre particules sont donc limitées. Cependant, elle contient une part non négligeable de fines. Ces petites particules viennent combler les vides entre les plus grosses, c'est pourquoi la densité aérée est plus élevée que pour la poudre lyophilisée (Tableau 27).

Mais ces nombreux contacts entre les éléments constitutifs de la poudre vont aussi favoriser la mise en place de forces interparticulaires, principalement du type Van der Waals (Abdullah & Geldart, 1999). Ces forces vont dominer l'arrangement des particules en limitant les phénomènes d'écroulement et donc fixer la valeur de densité aérée. Au contraire, le tassement de la poudre lors de la mesure de la densité tassée va entraîner le réarrangement spatial des particules en les affranchissant de ces contraintes liées à la présence de forces interparticulaires (Wong, 2000). Ainsi, une forte valeur de densité tassée est obtenue (Tableau 27).

IV. CHOIX DE LA METHODE DE PRODUCTION DES NOYAUX SECS EN VUE DU PELLICULAGE

Cette caractérisation des poudres obtenues en fonction de la méthode de séchage employée a mis en évidence de grosses différences tant au niveau morphologique que chimique ou physique.

La lyophilisation est une méthode simple mais relativement coûteuse surtout du fait de la nécessité de couplage avec une étape préalable de broyage. Elle permet la production de particules à faible humidité résiduelle, mais présentant une forte hétérogénéité de taille et de forme. L'encapsulation matricielle des deux substrats est bonne mais l'écoulement de la poudre obtenue est insatisfaisant ce qui peut compliquer son application industrielle.

La granulation est une méthode facile à extrapoler à l'industrie. Elle permet de produire des particules de plus grande taille que les autres méthodes. La morphologie des particules est intéressante et les propriétés d'écoulement de la poudre obtenue sont bonnes. Cependant, l'encapsulation matricielle est faible, laissant les produits sensibles à la périphérie de la particule et des problèmes de prises en masse apparaissent rapidement.

L'atomisation est la méthode la plus facile à extrapoler à l'industrie. Elle a un coût modéré et de nombreuses entreprises possèdent déjà les équipements nécessaires. Les particules obtenues sont parfaitement sphériques ce qui faciliterait le pelliculage. Cependant, leur taille reste faible et surtout la présence de poussières limite l'utilisation industrielle de la poudre de par les risques d'allergies sous jacents. L'humidité résiduelle est bonne et l'encapsulation satisfaisante. Son écoulement, comme celui de la poudre lyophilisée, est médiocre et nécessite des améliorations.

La réalisation d'un compromis entre les différentes propriétés des poudres, nous a conduit à retenir l'atomisation comme méthode de production des noyaux. Toutefois, l'écoulement de la poudre est peu satisfaisant. Cette propriété d'usage est importante à maîtriser car elle intervient pour la mise en silo de stockage, en sac, le transport pneumatique, le dosage ou encore l'aptitude à la dispersion (Vasseur, 1999). Il est donc nécessaire d'améliorer les propriétés rhéologique de la poudre atomisée afin d'en faciliter la manipulation.

Pour améliorer les propriétés d'écoulement d'une poudre, il est possible de procéder à quelques aménagements comme :

✧ **contrôler les paramètres environnementaux**, par exemple l'humidité ou la température, lors de l'utilisation. Mais, cette solution implique souvent des coûts d'installation élevés ;

✧ **apporter de l'énergie** par l'ajout de vibreurs ou d'extracteurs évite aussi les phénomènes de prise en masse mais cela accroît considérablement le coût de production et est parfois impossible à réaliser sur des unités existantes très compactes ;

✧ **utiliser des additifs** pour améliorer la fluidisation de la poudre ;

✧ **modifier les propriétés intrinsèques** des poudres par un pelliculage.

C'est cette dernière solution qui est retenue car la deuxième étape de la réalisation de la microbille est le pelliculage de la lactoperoxydase et de la glucose oxydase autour du noyau de substrats obtenu par atomisation.

Ainsi, l'addition de cet enrobage d'enzymes va modifier l'état de surface ainsi que diverses propriétés telles que la morphologie, la taille, ou encore l'humidité résiduelle. Il est donc intéressant de reproduire les expériences précédentes sur les microbilles afin de rechercher l'impact du pelliculage sur le comportement de la poudre formée.

V. PELLICULAGE DE LA GLUCOSE OXYDASE, LA LACTOPEROXYDASE ET DE DEUX ENROBAGES SECONDAIRES

Comme précédemment, afin de simplifier les comparaisons, une seule composition de microbille est étudiée. Ces microbilles sont préparées à partir du noyau du type S_{200} obtenu par atomisation, pelliculé successivement de lactoperoxydase puis de glucose oxydase. Sur ces microbilles de LPS, deux enrobages supplémentaires ont été réalisés, l'un à base de gomme acacia, l'autre de gomme acacia et de carraghénane. La gomme acacia a été retenue afin de tester son influence sur la stabilité des activités enzymatiques et le carraghénane pour modifier la vitesse de dissolution de la microbille.

Trois types de microbilles sont donc étudiés :

- ✧ **Le type S_{200}E** obtenu après pelliculage de la glucose oxydase puis de la lactoperoxydase sur un noyau du type S_{200}
- ✧ **Le type S_{200}EG** formé de microbilles S_{200}E pelliculées de gomme acacia
- ✧ **Le type S_{200}EGC** où les microbilles S_{200}EG sont pelliculées de carraghénane.

Ces microbilles de LPS avec et sans pelliculages secondaires sont tout d'abord caractérisées au niveau morphologique et physico-chimique. Ensuite, l'influence du pelliculage sur l'écoulement de la poudre formée par ces microbilles est étudiée.

V.1. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE

V.1.1. OBSERVATION MACRO ET MICROSCOPIQUE

L'observation macroscopique des poudres formées par les différentes microbilles ne révèle pas de différences morphologiques importantes. Cependant, l'écoulement des trois poudres semble être différent.

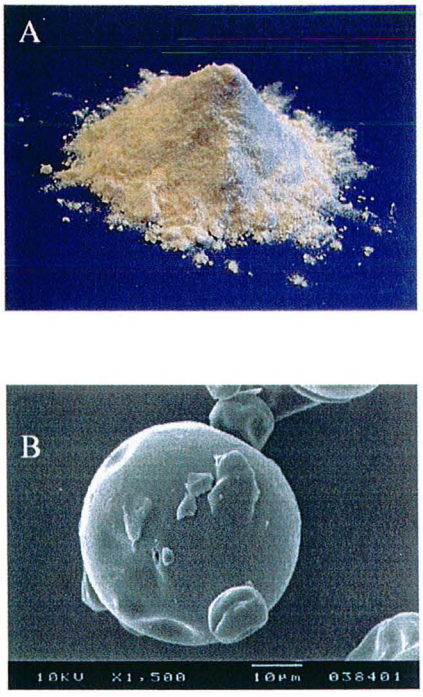


Figure 53 : observation macro (A) et microscopique (B) de la poudre formée de microbilles $S_{200}E$

La poudre $S_{200}E$, obtenue après pelliculage des deux enzymes, a un comportement très similaire à celle avant le pelliculage (Figure 40). Des phénomènes de mottage subsistent et la poudre semble encore très cohésive (Figure 53).

Les **microbilles constitutives** sont généralement sphériques. Le pelliculage est uniforme et homogène. Comme lors de l'observation des noyaux seuls, quelques petites particules et des fragments de microbilles sont agglomérées sur la surface de microbilles plus grosses (Figure 53).

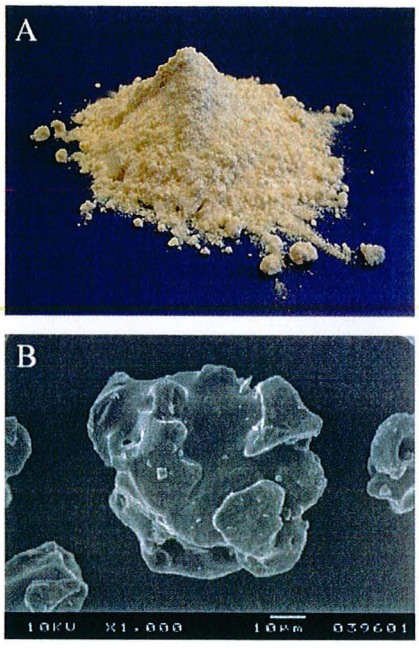


Figure 54 : observation macro (A) et microscopique (B) de la poudre formée de microbilles $S_{200}EG$

La poudre $S_{200}EG$, réalisée avec un second pelliculage de gomme acacia, présente moins de phénomènes de mottage que la $S_{200}E$. Toutefois, l'aspect plutôt conique du tas de poudre est, comme pour la $S_{200}E$, caractéristique d'une poudre cohésive aux mauvaises propriétés d'écoulement (Figure 54). **Les particules** obtenues sont moins sphériques et plus anguleuses que les précédentes. De nombreuses microbilles ont été fracturées entre les deux phases d'enrobage. Des débris sont visibles sur l'ensemble de la préparation. Cependant, la qualité du pelliculage reste bonne. Il apparaît relativement homogène (Figure 54).

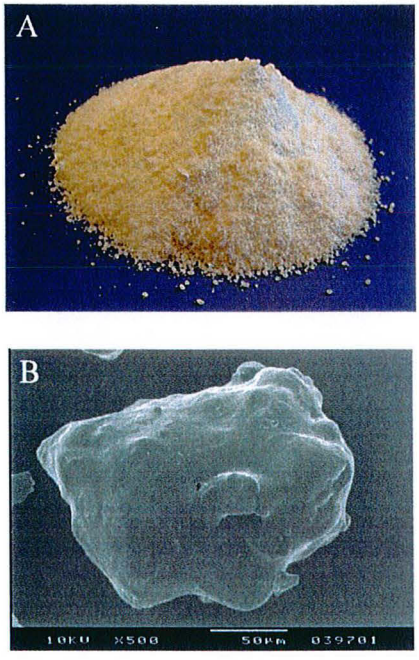


Figure 55 : observation macro (A) et microscopique (B) de la poudre formée de microbilles $S_{200}EGC$

La poudre $S_{200}EGC$ a une granulométrie plus importante que les deux précédente. Elle s'écoule naturellement, formant un tas de poudre peu élevé. Son écoulement semble meilleur que ceux des poudres $S_{200}E$ et $S_{200}EG$. L'addition de carraghénane donne à la poudre une couleur jaune plus prononcée.

Les particules se rapprochent désormais du sphéroïde. Le pelliculage est continu. Il a été réalisé sur des particules agglomérées car il est possible de deviner des silhouettes de microbilles sous le pelliculage (Figure 55).

V.1.2. ETUDE DE LA MORPHOLOGIE PAR ANALYSE D'IMAGES

L'étude de la morphologie par analyse d'images permet de quantifier les différences de forme observées ci-dessus. Comme précédemment, l'éloignement de la valeur calculée par rapport à celle du cercle permet de visualiser les modifications de morphologie des particules et l'écart type des mesures d'apprécier l'homogénéité de forme de la poudre.

Pour mémoire, les valeurs des descripteurs morphologiques calculées pour les particules avant pelliculage (S_{200}) sont reportées dans le tableau ainsi que les caractéristiques d'un cercle auxquelles sont comparées les nouvelles données (Tableau 28).

	Circularité	*Fmax/Fmin*	*Fmax/Deq*	*Robustesse*	*PGC*
S_{200}	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.07	0.03 ± 0.06
$S_{200}E$	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.2	1.2 ± 0.1	0.7 ± 0.08	0.09 ± 0.06
$S_{200}EG$	1.4 ± 0.4	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.1	0.7 ± 0.08	0.12 ± 0.06
$S_{200}EGC$	1.4 ± 0.4	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.1	0.7 ± 0.09	0.3 ± 0.5
Cercle	*1*	*1*	*1*	*0.8*	*0*

Tableau 28 : descripteurs de forme calculés par analyse d'images, S_{200} : 1040 particules analysées, $S_{200}E$: 1052 particules, $S_{200}EG$: 906 particules, $S_{200}EGC$: 887 particules

L'addition d'un pelliculage entraîne une perte de sphéricité des particules. Progressivement, leur circularité s'éloigne de celle du cercle. Les indices d'élongation augmentent traduisant un allongement des particules. L'indice de plus grande concavité (PGC) augmente avec le nombre d'enrobages, les microbilles sont donc de plus en plus irrégulières. Cependant, les écart-types des différentes mesures sont faibles quelque soit la composition testée. Les 3 populations de microbilles présentent donc une bonne homogénéité de taille (Tableau 28).

V.1.3. DISTRIBUTION DE TAILLE

La distribution de taille des microbilles est comparée à celle des noyaux avant pelliculage afin de déterminer l'impact du pelliculage.

	d_{10} (µm)	d_{50} (µm)	d_{90} (µm)	Span
S_{200}	14 ± 0.5	37 ± 1	84 ± 1	1.8
$S_{200}E$	28 ± 0.3	61 ± 0.3	140 ± 1.7	1.82
$S_{200}EG$	26 ± 0.4	61 ± 0.7	151 ± 10	2.04
$S_{200}EGC$	62± 1.1	158 ± 2.5	479± 21	2.63

Tableau 29 : caractérisation granulométrique des poudres après différents pelliculages.

L'addition d'un pelliculage augmente la taille des particules (Tableau 29). Avant le pelliculage, les noyaux obtenus par atomisation présentaient une taille moyenne de 37µm. L'enrobage des enzymes entraîne une augmentation du d_{50} de plus de 60% (Tableau 29). Cette forte augmentation du diamètre moyen des particules est surprenante car la quantité d'enzymes ajoutée ne représente qu'un faible pourcentage de la masse totale des microbilles. Il est probable que le phénomène visualisé résulte du cumul de plusieurs modifications. L'augmentation de taille réelle des particules se conjugue à un déplacement de la distribution granulomètrique vers la droite suite à la disparition des fines et à la réalisation d'une légère granulation avant le pelliculage.

Il n'y a pas de différence de taille moyenne avant ($S_{200}E$) et après addition du pelliculage secondaire de gomme acacia ($S_{200}EG$). Cependant, le span de la distribution est plus important démontrant une plus forte hétérogénéité de taille de la population (Tableau 29). Les particules agglomérées sont plus nombreuses car le d_{90} augmente mais de façon surprenante, le d_{10} diminue légèrement.

Cette baisse de la limite basse de la distribution est due à la présence de nombreux fragments de particules déjà remarqués en observation microscopique. Cette fracturation des microbilles ne peut pas pour le moment être expliquée.

L'ajout du dernier enrobage de carraghénane ($S_{200}EGC$) conduit à une forte augmentation de la taille moyenne des microbilles, le d_{50} devient largement supérieur à 100µm (Tableau 29). Le span de la distribution est aussi plus important que pour les 3 autres conditions, la population est donc de plus en plus hétérogène en termes de taille.

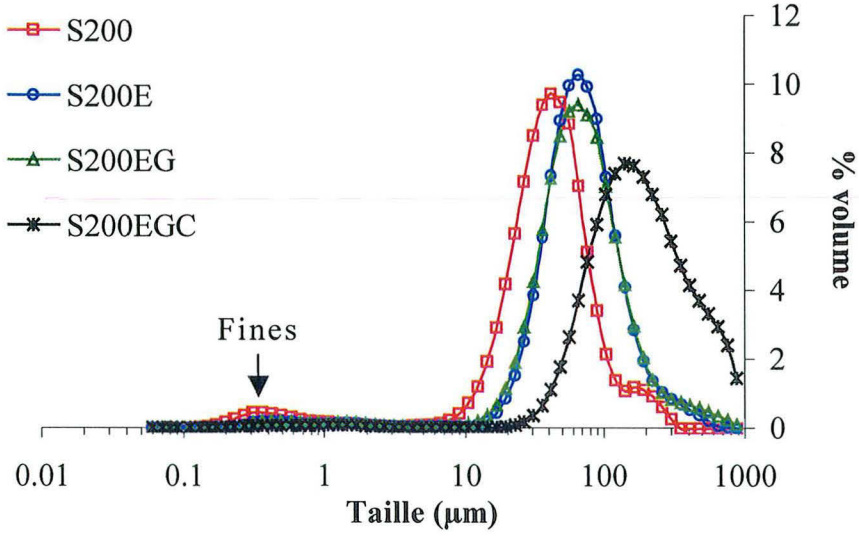


Figure 56 : influence du pelliculage sur la distribution de taille des microbilles de LPS

Le pelliculage, en plus de permettre l'augmentation de la taille moyenne des particules, conduit à la réduction de la quantité de fines (Figure 56). Cette suppression des fines a un double intérêt. Conjugué à l'augmentation de la taille des particules, elle a une répercussion directe sur le comportement rhéologique des poudres. Mais surtout, les microbilles ne présentent plus de risque pour la santé public. Les fines sont à la base des phénomènes d'allergie qui apparaissent chez les manipulateurs des poudres principalement lors de l'utilisation d'enzymes. La réduction des fines est donc un plus pour l'industrialisation du produit.

En conclusion, la caractérisation morphologique des microbilles de LPS, en fonction du type de pelliculage appliqué, a montré que :

✧ **L'addition d'un premier pelliculage à base de glucose oxydase et de lactoperoxydase ($S_{200}E$)** n'a qu'un impact limité sur la morphologie des particules. La population présente toujours une bonne homogénéité de forme. La taille moyenne est augmentée et la quantité de fines réduite. La distribution de taille est légèrement plus étroite qu'avant le pelliculage. Les microbilles présentent donc une meilleure homogénéité de taille.

✧ **Le second pelliculage de gomme acacia ($S_{200}EG$)** ne modifie pas significativement la taille des particules. Mais le span de la distribution est plus important, la population présente donc une hétérogénéité de taille plus marquée avec moins de fines. La morphologie des particules est légèrement modifiée. Les microbilles sont moins rondes, plus allongées et irrégulières.

✧ **Le dernier enrobage de carraghénane ($S_{200}EGC$)** déplace fortement la distribution granulométrique vers les grandes tailles. L'hétérogénéité de taille est importante. Morphologiquement, les particules s'éloignent de plus en plus de la sphère.

V.2. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES MICROBILLES

V.2.1. HUMIDITE RESIDUELLE

L'humidité résiduelle de chaque poudre est obtenue par différence de masse avant et après une nuit à 110°C.

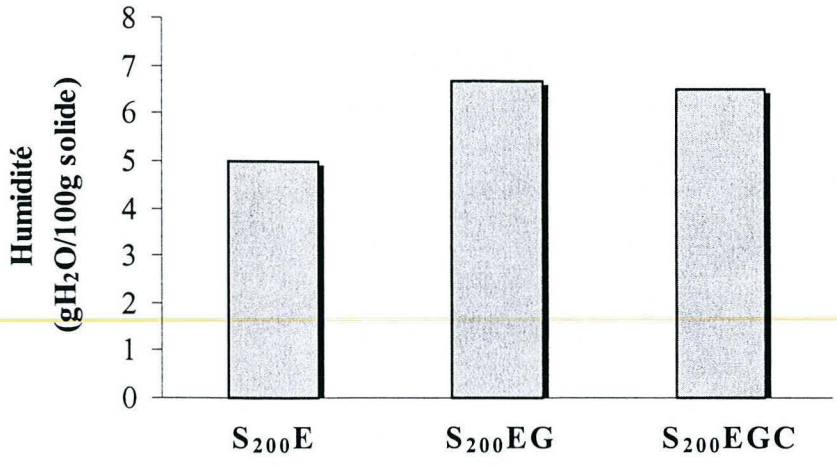


Figure 57 : humidité résiduelle des poudres obtenues après pelliculage de la glucose oxydase et de la lactoperoxydase ($S_{200}E$), de gomme acacia ($S_{200}EG$) et de carraghénane ($S_{200}EGC$)

Durant l'addition des deux enzymes et des enrobages de gomme et de carraghénane, l'humidité résiduelle augmente (Figure 57). La glucose oxydase étant une enzyme thermosensible, le procédé d'enrobage a été conduit à une température très basse afin de limiter les phénomènes de dénaturation de l'enzyme. La température du produit n'excédait jamais une trentaine de degrés (M&M). Une étape de séchage de 10 min succédait systématiquement aux pelliculages mais ce n'est pas suffisant pour aboutir à des humidités très faibles comme dans le cas de l'atomisation. Toutefois, ces taux d'humidité résiduelle restent acceptables pour une application industrielle.

V.2.2. Isothermes de sorption

L'évolution du caractère hydrophile des poudres est évaluée par comparaison des isothermes de sorptions de $S_{200}E$, $S_{200}EG$ et $S_{200}EGC$ à celui des noyaux avant pelliculage (S_{200}).

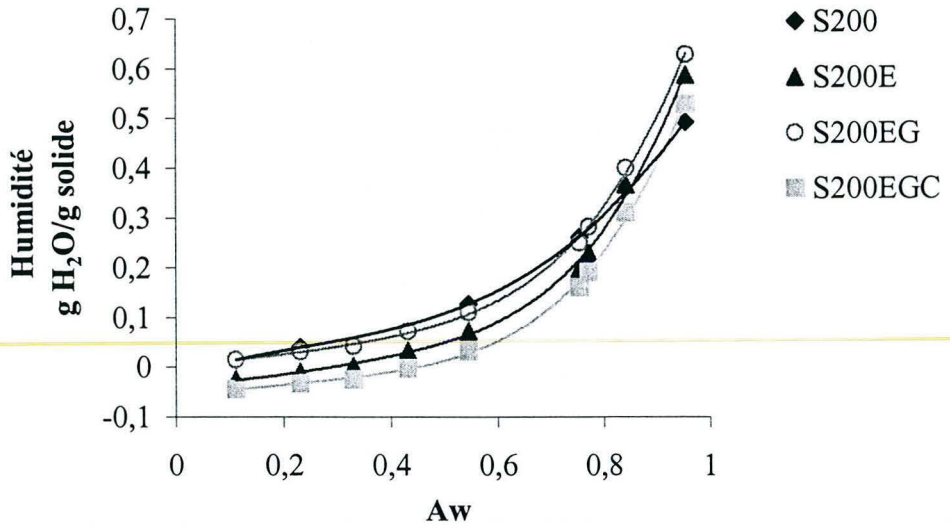
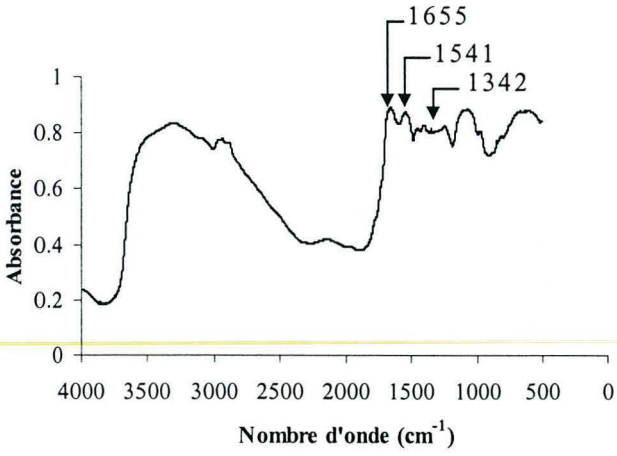


Figure 58 : isothermes de sorption des poudres S_{200}, $S_{200}E$, $S_{200}EG$ et $S_{200}EGC$

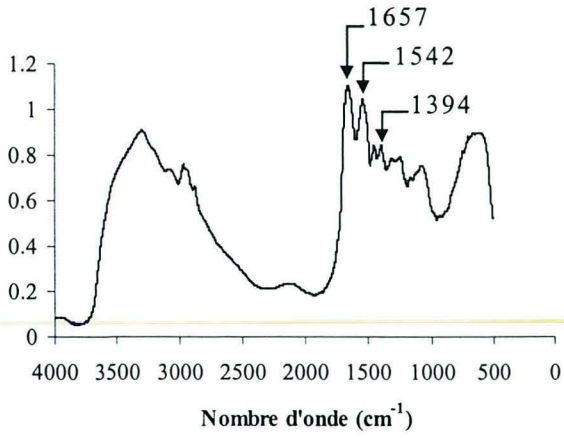
Le comportement des 3 poudres pelliculées est similaire à celui de la poudre constituée exclusivement des noyaux (Figure 58).L'addition des enrobages supplémentaires, à base de gomme acacia ou de carraghénane, ne modifie pas le comportement des microbilles vis-à-vis de l'humidité ambiante.

V.2.3. Analyse de surface par spectrometrie infrarouge

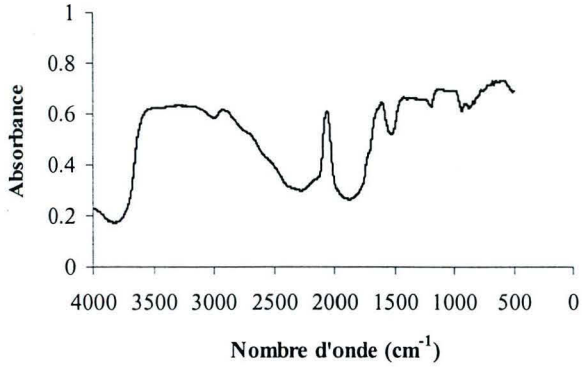
Les propriétés de surface des microbilles sont étudiées par spectrométrie infrarouge pour mettre en évidence la présence des enzymes et des polymères pelliculés à la surface des microbilles. De plus, cette méthode permet de rechercher des différences chimiques qui peuvent influencer les interactions interparticulaires et donc l'écoulement des poudres.



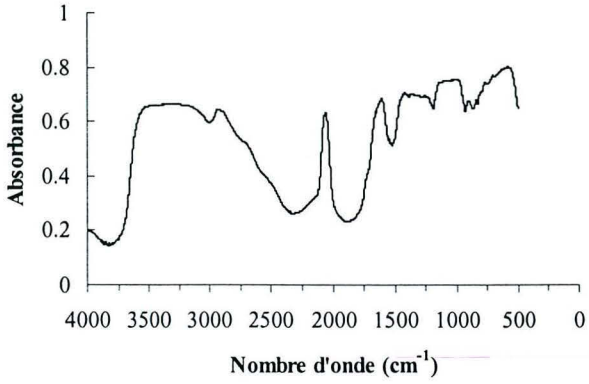
a. glucose oxydase



b. lactoperoxydase



c. poudre $S_{200}E$



d. S_{200}/LPO

Figure 59 : spectres RDITF (Réflexion Diffuse Infrarouge à Transformé de Fourier) de la glucose oxydase (a), la lactoperoxydase (LPO, b), la poudre $S_{200}E$ (c) et la poudre S_{200} pelliculée seulement de lactoperoxydase (S_{200}/LPO, d)

Les spectres de la lactoperoxydase et de la glucose oxydase sont très similaires, mais celui de la LPO est mieux défini. Les pics sont plus intenses et mieux résolus (Figure 59a et b). Les deux enzymes se reconnaissent par la présence des pics caractéristiques des fonctions amides :

✧ **LPO** : amide I = 1657 cm^{-1}, amide II = 1542 cm^{-1}

✧ **GOD** : amide I = 1655 cm^{-1} et amide II = 1541 cm^{-1}

Cependant, la lactoperoxydase se différencie par un pic spécifique à 1394 cm^{-1} et la glucose oxydase par la bande située à 1340 cm^{-1} (Figure 59a et b).

La réalisation de la poudre $S_{200}E$ est constituée de trois étapes :

- ✧ la création du noyau sec de substrats (S_{200}) dont l'état de surface a été étudié précédemment,
- ✧ le pelliculage de la lactoperoxydase (S_{200}/LPO)
- ✧ le pelliculage de la glucose oxydase ($S_{200}E$)

Entre les deux phases d'enrobage des enzymes, des prélèvements de poudre ne contenant que la lactoperoxydase ont été réalisés. Cette poudre intermédiaire est appelée S_{200}/LPO (Figure 59).

Le spectre infrarouge de la poudre $S_{200}E$ peut donc être comparé à celui du noyau comportant exclusivement la lactoperoxydase (S_{200}/LPO) et à ceux des enzymes natives pour mettre en évidence la présence des enzymes à la surface de la microbille. La comparaison directe des spectres étant difficile à effectuer, des soustractions sont réalisées en utilisant la bande du thiocyanate comme référence. Le spectre du noyau S_{200} est soustrait à celui de la microbille ($S_{200}E$) afin de révéler la présence des deux enzymes. Le spectre de la microbille sans GOD (S_{200}/LPO) est utilisé pour rechercher les pics caractéristiques de la LPO (S_{200}/LPO – S_{200}) et de la GOD ($S_{200}E$ – S_{200}/LPO). Ces différentes soustractions sont récapitulées par la figure suivante (Figure 60).

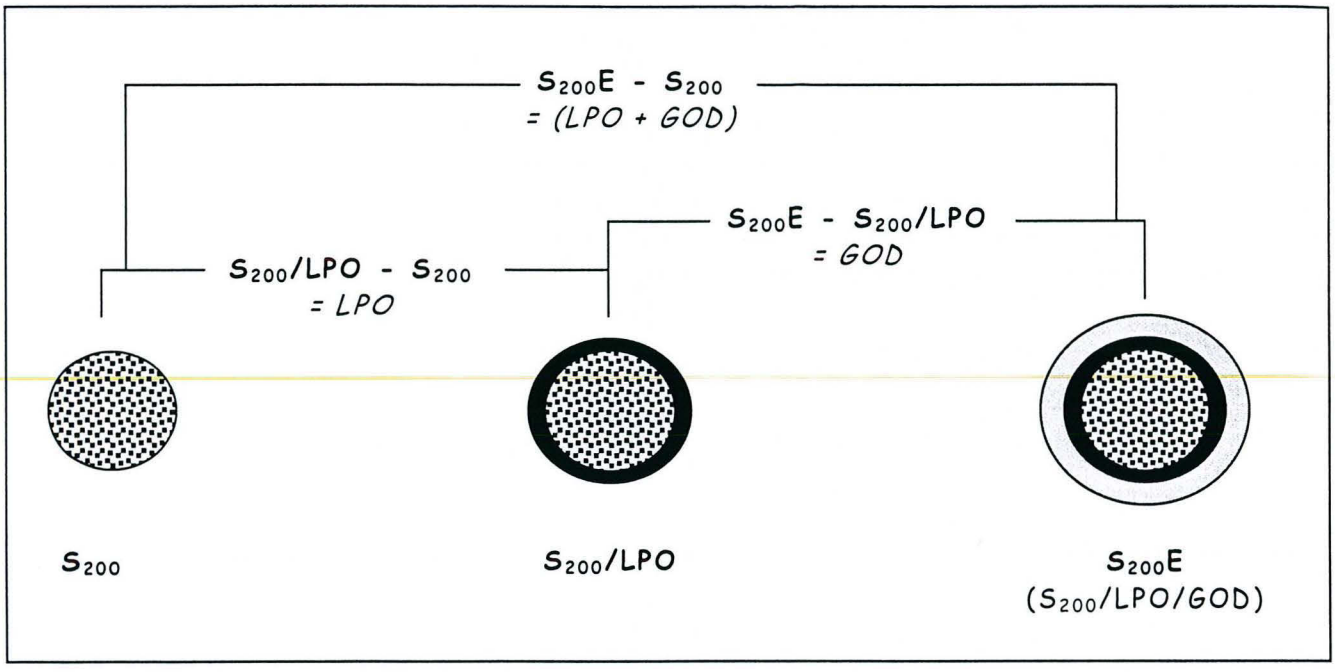
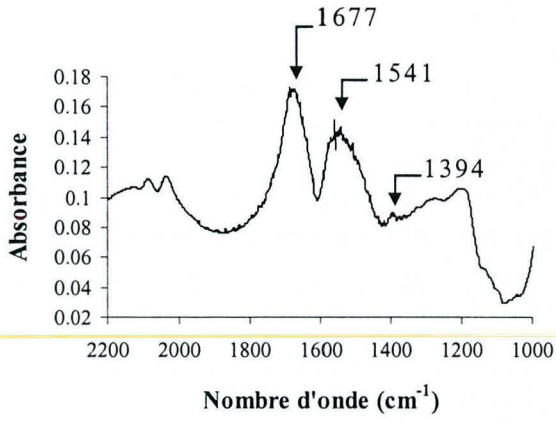


Figure 60 : schéma récapitulatif des soustractions (gras) de spectres infrarouge effectuées et des composés ainsi mis en évidence (*italique*)

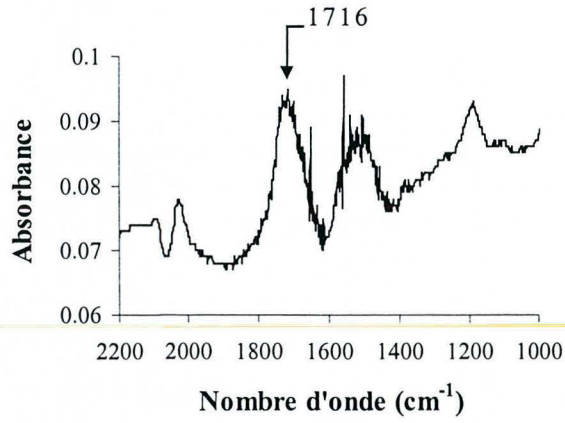
L'identification des enzymes se faisant principalement dans la zone comprise entre 0 et 2200 cm^{-1}, seule cette partie des spectres obtenus sera représentée. Ainsi les pics d'intérêt sont mieux définis et donc plus facile à identifier.

La lactoperoxydase peut être reconnue par la présence de ses pics caractéristiques à 1657, 1542 et 1394 cm^{-1}, absents du spectre des noyaux avant pelliculage.

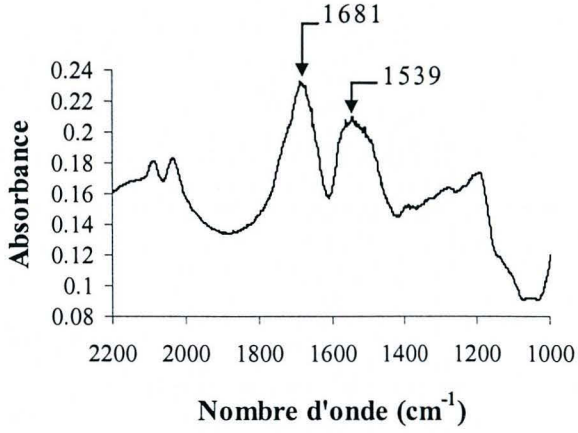
Sur le spectre de la soustraction S_{200}/LPO – S_{200}, ces 3 pics propres à la lactoperoxydase sont mis en évidence (Figure 61a). Les bandes à 1394 et 1541 cm^{-1} sont présentes à l'identique par rapport au spectre d'origine de l'enzyme (Figure 59b). Au contraire, la bande initialement située à 1657 cm^{-1} est décalée de 20 cm^{-1}, apparaissant à 1677 cm^{-1} (Figure 61a). La bonne répercussion des bandes à 1394 et 1541 cm^{-1}, nous autorise à conclure à une absence de décalage des bandes suite à la soustraction. L'augmentation du nombre d'onde du pic 1677 est donc représentative d'une réalité chimique.



a- S_{200}/LPO – S_{200} = LPO



b- S_{200}E – S_{200}/LPO = GOD



c- S_{200}E – S_{200} = LPO + GOD

Figure 61 : spectres RDITF (Réflexion Diffuse Infrarouge à Transformé de Fourier) des soustractions réalisées afin de mettre en évidence la contribution de la lactoperoxydase (LPO, a) et de la glucose oxydase (GOD, b) et des deux enzymes simultanément (c)

Le domaine d'élongation autour de 1677 cm^{-1} correspond à la liaison C=O des fonctions amide I. L'augmentation de la longueur d'onde d'élongation traduit un caractère C=O plus marqué tel qu'on peut le rencontrer pour les élongation d'amides libres (De Donato *et al.*, 1999).

Ces observations nous permettent de proposer deux cas de figures :

✧ **dans le domaine de la monocouche**, ces C=O libres ne participent pas à la liaison de la LPO sur le support c'est-à-dire le noyau S_{200},

✧ **dans un domaine multicouche**, les liaisons carboxyles n'interviennent pas dans les interactions LPO/LPO et donc dans la structuration de la multicouche.

Il serait donc intéressant de déterminer le taux de recouvrement de l'enzyme afin de choisir le cas de figure le plus approprié.

La méthode conventionnelle pour déterminer le taux de recouvrement implique la connaissance de la surface spécifique, de la quantité d'enzyme adsorbée et de l'encombrement de la molécule de LPO. Malheureusement, l'encombrement d'une molécule de lactoperoxydase n'est pas connu. De plus, les essais de détermination de la surface spécifique ont donné un résultat trop imprécis compte tenu de sa très faible valeur (<0.8 m^2). L'utilisation de la méthode conventionnelle n'est donc pas possible. Pour contourner le problème, le taux de recouvrement est estimé par analogie avec un système adsorbant/adsorbé connu et similaire. En effet, pour valider la comparaison, le système modèle doit être proche du système étudié. Dans notre cas, il doit avoir une faible surface spécifique (<0.8 m^2) et posséder une bande test avec un fort coefficient d'adsorption comme l'amide I de notre système (1677 cm^{-1}). Pour cette estimation, le couple xanthate/sulfure de plomb est retenu.

Sur le spectre de la soustraction (Figure 61a), l'intensité de la bande C=O est égale à 0.1 unité d'absorbance (UA). Dans le système analogue, de telles intensités se retrouvent pour des taux de recouvrement compris entre 3 et 7 couches, selon le degré d'oxydation du xanthate qui va modifier l'encombrement de la molécule (De Donato *et al.*, 1990).

La lactoperoxydase est donc présente sur le noyau de substrat et forme un système multicouche. Les liaisons carboxyles de la molécule ne participent pas à la structuration de cette multicouche. Elles ne sont pas impliquées dans des interactions LPO/LPO au niveau d'une particule ou entre les particules.

Sur le spectre de soustraction globale : $S_{200}E - S_{200}$, permettant de mettre en évidence les deux enzymes, la bande à 1539 cm^{-1} est fixe (Figure 61c). Au contraire, la bande de l'amide I est encore plus déplacée vers le haut. Elle se retrouve à 1681 cm^{-1} soit +24 cm^{-1} par rapport à la bande de la LPO native (Figure 59b). Cette nouvelle augmentation de fréquence est la résultante de la contribution de la glucose oxydase qui probablement, comme la LPO, possède une fonction carboxyle libre.

Malheureusement, le spectre de soustraction $S_{200}E - S_{200}$/LPO permettant la mise en évidence de la glucose oxydase est délicat à interpréter en termes de position de bandes (Figure 61b). La bande caractéristique des amides I est fortement déplacée vers les hautes fréquences (1716 cm^{-1}). Cette fréquence d'élongation n'est plus assimilable au groupement C=O des amides, même libres. Il n'est donc pas possible de conclure quant à la présence de la glucose oxydase.

Toutefois, il est possible de raisonner seulement sur l'intensité des pics. En effet, l'intensité de la bande à 1716 cm^{-1} (Figure 61b) est beaucoup plus faible que celle de la bande à 1677 cm^{-1} de la LPO (Figure 61a). Si, le taux de recouvrement est estimé par comparaison au système xanthate/sulfure de plomb, une intensité de 0.025 UA correspond à une monocouche. On se trouve en limite de détection. Le déplacement des pics vers les hautes fréquences est donc probablement un artéfact de la soustraction. La contribution de la GOD est trop faible, rendant sa détection par soustraction difficile. De plus, sur le spectre de soustraction global mettant en évidence la contribution des deux enzymes, l'intensité du pic à 1681 cm^{-1} est très voisine de 0.1 UA, c'est à dire de l'intensité du pic pour la LPO seule (Figure 61c). Ce résultat renforce l'hypothèse d'une faible contribution de la GOD ce qui est corrélé avec les quantités d'enzymes appliquées où la concentration en GOD est 35 fois plus faible que la concentration en LPO.

La lactoperoxydase et la glucose oxydase sont présentes à la surface des microbilles $S_{200}E$. La quantité de LPO appliquée est beaucoup plus importante que la quantité de GOD. Mais, dans les deux cas, les fonctions C=O des groupements amides n'interviennent pas dans les interactions entre les molécules au sein d'une microbilles ou entre plusieurs microbilles.

Les spectres infrarouge des deux autres types de microbilles, $S_{200}EG$ possédant un pelliculage de gomme acacia et $S_{200}EGC$ secondairement pelliculées de carraghénane, ont été réalisés et comparés aux spectres de la gomme et du carraghénane purs (Figure 62).

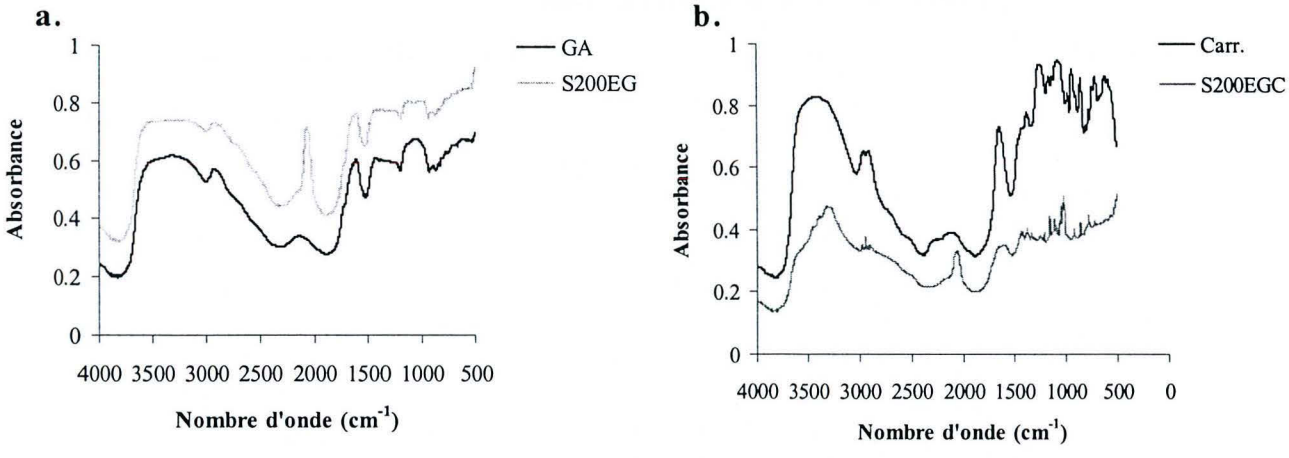


Figure 62 : comparaison des spectres RDITF (Réflexion Diffuse Infrarouge à Transformé de Fourier) des microbilles $S_{200}EG$ et de la gomme acacia (GA, a) et des microbilles $S_{200}EGC$ et du carraghénane (Carr., b)

Les spectres des deux microbilles sont similaires à ceux des produits pelliculés, hors mis la présence d'un pic additionnelle à 2050 cm^{-1} dû au thiocyanate (Figure 62). L'ajout d'un enrobage supplémentaire à celui des enzymes entraîne la diminution de l'intensité de ce pic. Le thiocyanate devient de moins en moins détectable à la périphérie de la microbille. Les enzymes ne sont plus détectables sur les spectres, leurs bandes caractéristiques se fondant aux bandes des polymères pelliculés.

V.2.4. Courbes de dissolution

Le carraghénane a été retenu pour sa faible solubilité dans l'eau froide. L'addition de ce polymère sur les microbilles de LPS a pour objectif de modifier la vitesse de dissolution des particules, de façon à réaliser des « pseudo » microréacteurs.

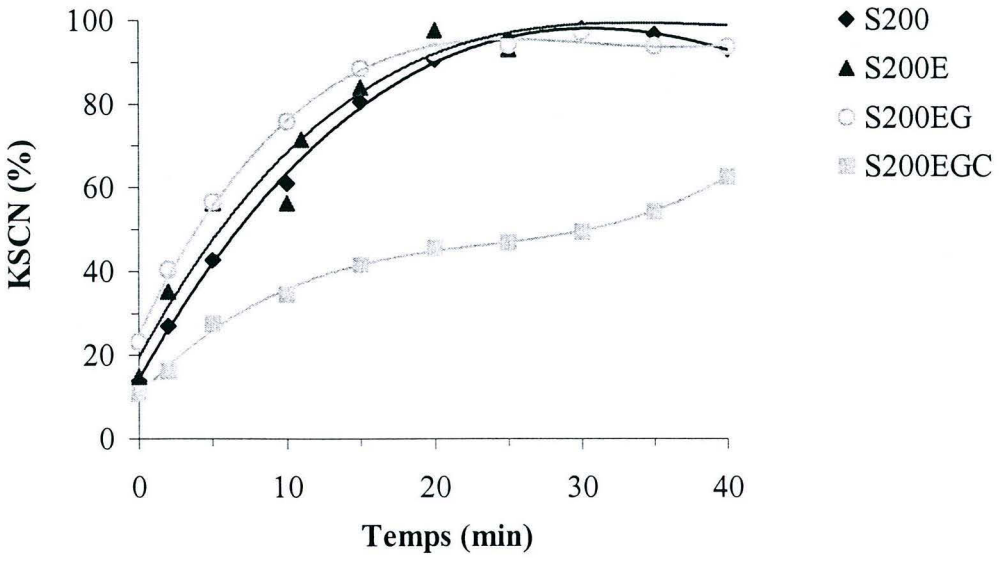


Figure 63 : suivi de la libération du thiocyanate en fonction de la nature du pelliculage (S_{200} : noyaux bruts, $S_{200}E$: S_{200} + enzymes, $S_{200}EG$: $S_{200}E$ + gomme acacia, $S_{200}EGC$: $S_{200}EG$ + carraghénane)

Les cinétiques de dissolutions des poudres S_{200}, $S_{200}E$ et $S_{200}EG$ sont identiques (Figure 63). L'addition du pelliculage contenant la glucose oxydase et la lactoperoxydase ou le pelliculage secondaire de gomme acacia n'influe pas sur la vitesse de dissolution des microbilles. Le pelliculage de carraghénane ralentit la solubilisation de la poudre (Figure 63). Après 40 min, la totalité de KSCN n'est toujours pas passée en solution. Le carraghénane est un polymère moins soluble dans l'eau que la gomme acacia, la présence sur la microbille temporise donc sa dispersion.

Il faut noter que les microbilles $S_{200}EGC$ sont plus grosses que les microbilles $S_{200}E$ ou $S_{200}EG$. Leur surface spécifique est donc moins importante que celles des deux autres types de microbilles. Les contacts avec l'eau sont moindres. La plus faible vitesse de dissolution des microbilles $S_{200}EGC$ est probablement la résultante de ces deux phénomènes, faible solubilité et plus petite surface spécifique.

Le pelliculage avec un polymère faiblement soluble tel que le carraghénane, permet donc de modifier la vitesse de dissolution des microbilles de LPS. Cette propriété sera à lier, dans la suite de l'étude, à l'activité antibactérienne du système. La concentration du produit antibactérien ($OSCN^-$) au niveau des microbilles peut modifier l'efficacité du système, en opposition avec les autres compositions où les constituants sont libérés très rapidement dans le milieu. Les microbilles pelliculées de carraghénane sont des systèmes à libération contrôlée. Les composants de la microbille sont piégés par le pelliculage, c'est donc le produit de la réaction, $OSCN^-$, qui va principalement diffuser dans le milieu. Dans les autres cas, la diffusion concerne tous les constituants de la microbille. La diffusion pouvant être un facteur limitant, une différence d'efficacité antibactérienne peut résulter de ce phénomène. La plus faible vitesse de dissolution va ralentir l'activation du système. La réaction de production de l'hypothiocyanite sera plus lente mais elle se maintiendra plus longtemps.

V.3. CARACTERISATION RHEOLOGIQUE DES MICROBILLES

Précédemment, il a été démontré que la poudre produite par atomisation possédait des propriétés rhéologiques peu satisfaisantes (III). Une des méthodes pour modifier l'écoulement d'une poudre est le pelliculage. L'enrobage va principalement, augmenter la taille globale des particules, réduire la quantité de fines et modifier les interactions de surface (Graindorge, 1994).

Dans le tableau suivant, la valeur obtenue pour la poudre constituée des noyaux avant pelliculage (S_{200}) est rappelée afin d'apprécier l'impact du pelliculage.

		S_{200}	$S_{200}E$	$S_{200}EG$	$S_{200}EGC$
Angle de repos	Deg.	51.2	50.2	40.1	43
Compressibilité	%	41.3	29.6	25.5	13.1
Angle de spatule	Deg.	57.2	50.4	44.8	55.2
Cohésion	%	23.8	61	30.4	46.5
Indice de « Flowability »		***42***	***42***	***59.5***	***60***
Angle de chute	Deg.	34.6	44.5	26	34.4
A. de différence	Deg.	16.6	5.7	14.1	8.6
Dispersibilité	%	44.8	12	21.7	22
Indice de « floodability »		***72***	***46***	***75***	***66.5***

Tableau 30 : caractérisation des propriétés d'écoulement des poudres obtenues avant (S_{200}) et après pelliculage des enzymes ($S_{200}E$), de gomme acacia ($S_{200}EG$) et de carraghénane ($S_{200}EGC$), par détermination de leurs indices de « flowability » et « floodability »

La présence d'un enrobage diminue fortement la compressibilité de la poudre. La valeur de la compressibilité s'amoindrit avec l'augmentation du nombre de pelliculages (Tableau 30). Cette baisse est principalement liée à l'accroissement de taille obtenu avec les pelliculages. En effet, la présence de gros particules favorise leur arrangement et ainsi la réduction des vides (Abdullah & Geldart, 1999). Les résultats de cohésion sont dispersés. La valeur obtenue pour la poudre $S_{200}E$ est très importante (Tableau 30). Une telle valeur est caractéristique d'une poudre très fortement cohésive. Or l'observation macroscopique ne corrobore pas cet état de fait. De même, les enrobages supplémentaires favorisent l'augmentation de la cohésion, même si cela reste dans une moindre mesure. Ce résultat n'est pas en accord avec les autres résultats du test d'écoulement.

En l'occurrence, les pelliculages ont favorisé la diminution de la compressibilité des poudres. Or cette donnée est directement corrélée à la cohésion (Kouadri-Henni *et al.*, 1999). Enfin, l'augmentation de taille obtenue avec les différents pelliculages devrait favoriser la diminution de la cohésion (Abdullah & Geldart, 1999). Le calcul des ratios d'Hausner sera donc intéressant pour vérifier ces résultats.

La poudre formée par les microbilles $S_{200}E$ a l'indice de « floodability » le plus faible. Elle est donc moins fluide et fusante que les trois autres poudres, qui ont un comportement très analogue (Tableau 30). Les expériences précédentes ont mis en relief une augmentation des interactions entre les particules après le pelliculage des enzymes. Globalement, ce phénomène se traduit par une diminution de la fluidité de la poudre. Les autres pelliculages favorisent la réduction de ces mêmes interactions, soit par modification des propriétés de surface ($S_{200}EG$), soit par accroissement de la taille ou la réduction du nombre de fines ($S_{200}EGC$). Si leur action est favorable à l'amélioration de la coulabilité de la poudre, indice de « flowability », elle n'a que peu d'effet sur sa fluidité, indice de « floodability ».

L'indice de « flowability » de la poudre $S_{200}E$ est similaire à celui de la poudre brute, S_{200} (Tableau 30). Le pelliculage des deux enzymes ne permet donc pas d'améliorer les propriétés d'écoulement de la poudre atomisée. Au contraire, les deux pelliculages secondaires à base de gomme acacia et de carraghénane, augmentent la valeur de l'indice. Si l'on se reporte à la grille d'évaluation établie par Carr (M&M, Tab.5), l'écoulement des deux poudres est défini comme normal.

Si pour la poudre $S_{200}EGC$, l'amélioration de l'écoulement peut être facilement corrélée à l'augmentation de la taille des particules, ce n'est pas le cas pour la poudre $S_{200}EG$. L'étude de la distribution granulométrique des poudres a montré que la taille moyenne des particules constituant la poudre $S_{200}EG$ est équivalente à celle de la poudre $S_{200}E$ (Tableau 29). Or, il n'y a pas d'amélioration de l'indice de « flowability » pour cette dernière. Le pelliculage intervient donc à un autre niveau.

Divers travaux réalisées sur l'étude de l'écoulement des solides divisés ont montré que les facteurs discriminants sont la taille et la distribution granulométrique (Wong, 2000), la forme (Hausner, 1967 ; Pons *et al.*, 2001) et les interactions interparticulaires (Abdullah & Geldart, 1999). L'ajout du pelliculage de gomme acacia en plus d'augmenter la taille des particules, permet de réduire la quantité de fines et de modifier la structure de surface, diminuant les forces de surfaces. Au contraire, la présence des enzymes en surface ($S_{200}E$) tend à les favoriser.

V.4. Influence du pelliculage sur le ratio d'Hausner

Pour mémoire, le calcul du ratio d'Hausner permet de classer les poudres en 3 catégories :

- **A**, poudres à bon écoulement, faiblement cohésive
- **AC**, poudres à comportement intermédiaire
- **C**, poudres cohésives à mauvais écoulement.

Cette appréciation du caractère cohésif d'une poudre et donc de son écoulement permet de temporiser les résultats de cohésion obtenus avec le testeur de poudre Hosokawa.

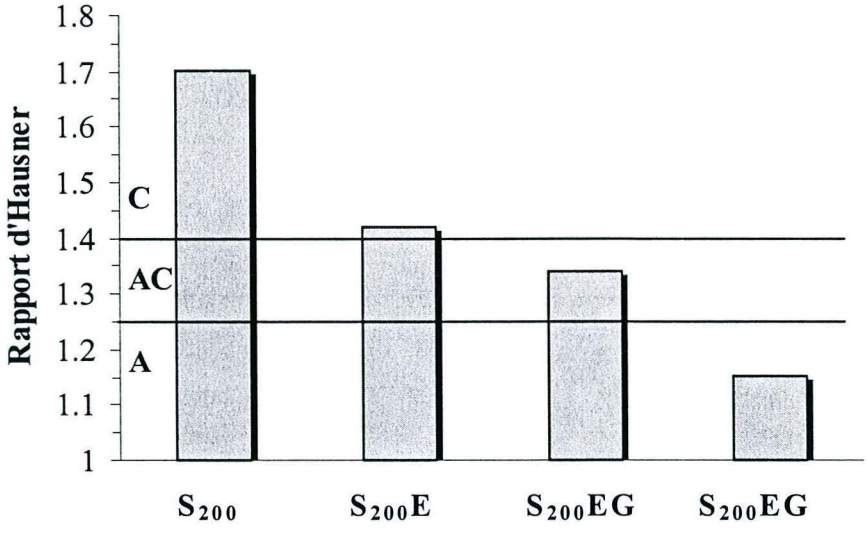


Figure 64 : évolution du ratio d'Hausner selon le type de pelliculage

La poudre $S_{200}E$, présente des propriétés d'écoulement mauvaises (Figure 64). Elle est cohésive. Ce résultat corrobore ceux de la détermination de l'indice de « flowability » et de la cohésion. Mais contrairement au résultat de la mesure de la cohésion obtenu avec le testeur de poudre Hosokawa (Tableau 30), la poudre $S_{200}E$ est moins cohésive que la poudre formée des noyaux avant pelliculage (S_{200}). Ceci apparaît plus en accord avec les diverses observations réalisées lors de la caractérisation de $S_{200}E$. Les deux autres pelliculages à base de gomme acacia ($S_{200}EG$) et de carraghénane ($S_{200}EGC$) ont un effet marqué sur le comportement de la poudre. Selon la classification établie par Geldart (1984), la poudre $S_{200}EGC$ est faiblement cohésive avec un bon écoulement. La poudre $S_{200}EG$ a un comportement intermédiaire. L'addition de ces enrobages facultatifs a donc un effet intéressant sur le comportement rhéologique de la poudre

En conclusion, le pelliculage des particules d'une poudre présentant un mauvais écoulement, permet d'améliorer significativement ce dernier. Le pelliculage agit principalement à deux niveaux, sur la modification des propriétés de surface et sur l'accroissement de la taille moyenne des particules. Dans notre étude, trois types de pelliculages ont été réalisés.

✧ **Le premier pelliculage à base de glucose oxydase et de lactoperoxydase ($S_{200}E$)** a entraîné une augmentation de la taille des particules et une réduction des fines. Mais la présence des enzymes à la surface à favorisé les interactions interparticulaires. Ainsi, la cohésion de la poudre est plus forte et l'écoulement reste médiocre.

✧ **Le second pelliculage à base de gomme acacia ($S_{200}EG$)** a permis la production de particules très similaires aux précédentes en termes de taille et de forme. Mais les propriétés de surfaces sont différentes de celles de la poudre $S_{200}E$. La cohésion de la poudre est réduite et l'écoulement légèrement amélioré. Elle présente dans toutes les analyses, un comportement intermédiaire entre celui de la poudre $S_{200}E$ et celui de la poudre $S_{200}EGC$.

✧ **Le dernier pelliculage de carraghénane (S_{200}EGC)** conduit à une très forte augmentation de la taille des particules. Ce phénomène est probablement prépondérant dans l'amélioration des propriétés d'écoulement de la poudre, car la taille est un facteur discriminant. Il est toutefois difficile de juger de l'importance du rôle des modifications de surface apportées par le carraghénane. Mais, la combinaison de ces différents facteurs a permis d'améliorer significativement l'écoulement de la poudre.

VI. CARACTERISATION MICROBIOLOGIQUE DES MICROBILLES DE LPS

L'objectif principal de l'encapsulation du système lactoperoxydasique, et de son générateur de peroxyde d'hydrogène, est de favoriser son application industrielle comme conservateur naturel. Les études précédentes ont montré que les microbilles mises au point contiennent tous les constituants du système multienzymatique, qu'elles forment une poudre facile à manipuler et ne présentant aucun risque majeur pour la santé. Désormais, l'impact de l'encapsulation sur l'activité antibactérienne est étudié.

Cette caractérisation microbiologique se déroule en deux temps pour répondre à deux questions principales :

✧ ***Est ce que l'encapsulation des substrats dans la gomme acacia ne limite pas l'activité de la lactoperoxydase et de la glucose oxydase ?***

✧ ***Est ce que les microbilles sont toujours suffisamment actives après l'étape de pelliculage ?***

VI.1. ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DU LPS UTILISANT DES SUBSTRATS ENCAPSULES

La première partie de la caractérisation microbiologique consiste donc à étudier l'activité du système en présence de substrats encapsulés dans la gomme acacia.

Trois types de noyaux sont testés.

- **SH** : glucose
- **S** : glucose + thiocyanate de potassium
- **SI** : glucose + iodure de potassium

Les noyaux SH ont été élaborés afin de déterminer l'activité antibactérienne parasitaire due à la production de peroxyde d'hydrogène par la glucose oxydase. Les noyaux du type S sont utilisés produire les microbilles de LPS « classique ». Enfin, le dernier type de noyaux, SI, permet l'élaboration de microbilles de LPS « substitué ». Ces dernières ont un double intérêt, tout d'abord, estimer l'efficacité du système en présence de KI mais aussi, identifier les phénomènes directement liés à la présence de KSCN et démontrer la modularité des microbilles.

Pour chaque type, 7 compositions sont mises au point, contenant 1, 10, 20, 50, 100, 200 et 400 fois les concentrations originales en substrats, en solution avant séchage. A la plus petite concentration (S_1), 50 mg de poudre correspondent à un apport de 0.09 mg de glucose et 0.02 mg de thiocyanate (ou d'iodure). A 200 fois ces concentrations, 13.6 mg de glucose et 2.7 mg de thiocyanate sont présents dans les 50 mg de poudre, et enfin à 400 fois, 20 mg de glucose et 4 mg de thiocyanate. Même s'il est très difficile de comparer les tests en culture liquide et en culture solide, il est intéressant de constater que les plus fortes concentrations (S_{400}) correspondent aux quantités classiquement apportées dans 100ml de milieu liquide pour déterminer l'activité anti-*Listeria monocytogenes* du système.

La quantification de l'activité antibactérienne est réalisée contre *Listeria monocytogenes*, par la méthode des cercles d'inhibition. Cette méthode de quantification en milieu solide permet de se placer dans des conditions les plus proches possibles des conditions ultérieures d'utilisation. La lactoperoxydase et la glucose oxydase sont ajoutées dans le milieu de culture à des concentrations respectives de 35 et 1 mg/l. *Listeria monocytogenes* est ensemencée à 10^4 UFC/ml.

Des dépôts de 50 mg de poudre sont réalisés au centre d'une boîte de Petri contenant un milieu de culture gélosé, *Listeria monocytogenes*, la lactoperoxydase et la glucose oxydase. Le diamètre de la zone d'inhibition est relevé après 8, 24, 48, 72 et 120h d'incubation à 37°C. A partir de cette mesure, la surface de la zone d'inhibition est calculée en l'assimilant à celle d'un cercle.

✧ L'effet antibactérien est qualifié de **bactériostatique** sur la durée précédent la repousse, si la souche recolonise la zone inhibée.

✧ L'effet est dit **bactéricide,** si après 120h d'incubation, la zone d'inhibition n'est pas recolonisée par la souche.

✧ Un effet intermédiaire a été observé où la zone d'inhibition était partiellement recolonisée pour aboutir à une zone plus petite mais stable sur 120h. Cet effet a été qualifié de **semi-bactéricide**, il cumule une zone de bactériostase et une zone de bactéricidie.

Des essais préalables d'innocuité de la gomme acacia, ainsi que des autres polymères utilisés dans cette étude, ont été réalisés contre *Listeria monocytogenes*. Il est apparu que tous les polymères employés n'avaient aucune activité antibactérienne.

VI.1.1. SYSTEME ENZYMATIQUE TEMOIN (SH)

Le couplage de l'activité lactoperoxydasique avec la glucose oxydase entraîne la production de deux agents antimicrobien, l'hypothiocyanite (ou hypoiodite) et le peroxyde d'hydrogène. Pour valider l'activation de la lactoperoxydase par les substrats encapsulés, il est important de vérifier que l'effet observé est bien la conséquence de la production d'$OSCN^-$ et pas seulement d'H_2O_2. Pour cela, des tests ont été réalisés avec des noyaux sans substrat pour la lactoperoxydase. Ainsi, l'activité antibactérienne d'H_2O_2 peut être quantifiée (Figure 65).

Les graphiques en radiant permettent de visualiser la surface inhibée sur l'axe principal. La comparaison de l'espacement entre les différentes courbes met en évidence la relation existant entre les compositions. Enfin, l'évolution de la surface inhibée au cours du temps définit le caractère bactériostatique ou bactéricide de l'action.

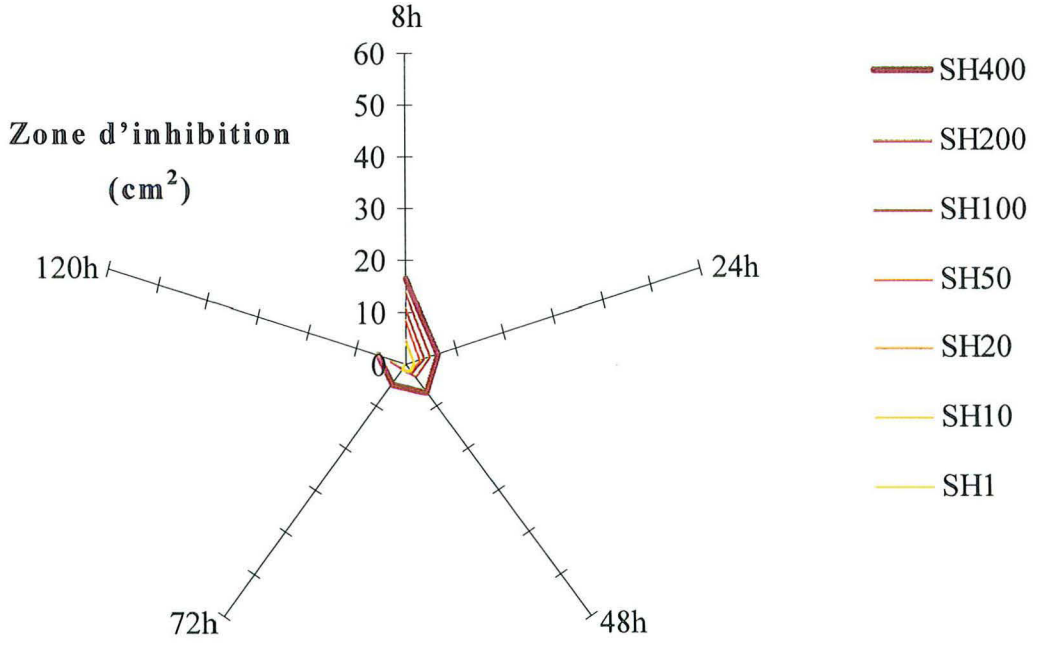


Figure 65 : zones d'inhibition obtenues contre *Listeria monocytogenes* avec des quantités croissantes de glucose, glucose oxydase (1 mg/l) et lactoperoxydase (35 mg/l) ajoutées dans la masse, écart-type moyen=1.2

L'effet anti-*Listeria monocytogenes* obtenu en absence d'activité lactoperoxydasique est parfaitement négligeable. L'activité du système glucose oxydasique est semi-bactéricide aux plus fortes concentrations. La zone d'inhibition à 8h est toujours supérieure à celle que l'on retrouve à 24h, mais après ce réajustement, aucune recolonisation ne s'opère dans la zone mesurée à 24h. Il y a donc deux zones distinctes, la première couvrant une quinzaine de cm^2, où une bactériostase de 8h est observable, et la seconde de quelques cm^2, où le système est bactéricide (Figure 65).

Cette faible activité antibactérienne est la résultante d'une plus faible toxicité de l'H_2O_2 combiné à une perte accrue due aux cumuls d'activités catalasiques parasitaires.

En effet, la glucose oxydase utilisée (Bio serae) possède une activité catalasique parasitaire importante. Le ratio activité oxydasique / activité catalasique est de 3.5 (données fournisseur). Cette activité catalasique est plus importante pour des pH supérieurs ou égaux à 6.35, pH du milieu TSAYE avant croissance de la souche et devient négligeable à pH 5. Les tests réalisés en présence de lactoperoxydase ont montré que cette activité contaminante ne permet pas d'inhiber la peroxydation du thiocyanate, même lorsqu'elle est maximale (Mahouche, 1999). C'est pourquoi, son effet est négligeable lorsque tout le système est présent (S).

De plus, la lactoperoxydase, en absence de substrat spécifique, développe une activité catalasique (Kholer & Jenzer, 1989). Enfin, *Listeria monocytogenes* est une bactérie catalase positive. Cette accumulation d'activités catalasiques est responsable de la perte d'une partie de l'H_2O_2 produit.

En outre, le pouvoir antibactérien d'H_2O_2 est beaucoup plus faible que celui de l'hypothiocyanite ou de l'hypoiodite. Par exemple, dans les années 60, la Food and Agriculture Organization (FAO) recommandait l'utilisation de 300 à 800 ppm de peroxyde d'hydrogène pour préserver le lait. Aujourd'hui, seulement 8 à 9 ppm d'H_2O_2 sont nécessaires pour activer le LPS et obtenir un résultat similaire.

VI.1.2. La composition LPS « classique » (S)

L'efficacité antibactérienne obtenue lors de l'activation de la glucose oxydase et de la lactoperoxydase par du glucose et du thiocyanate encapsulés dans la gomme acacia, est reporté à la Figure 66.

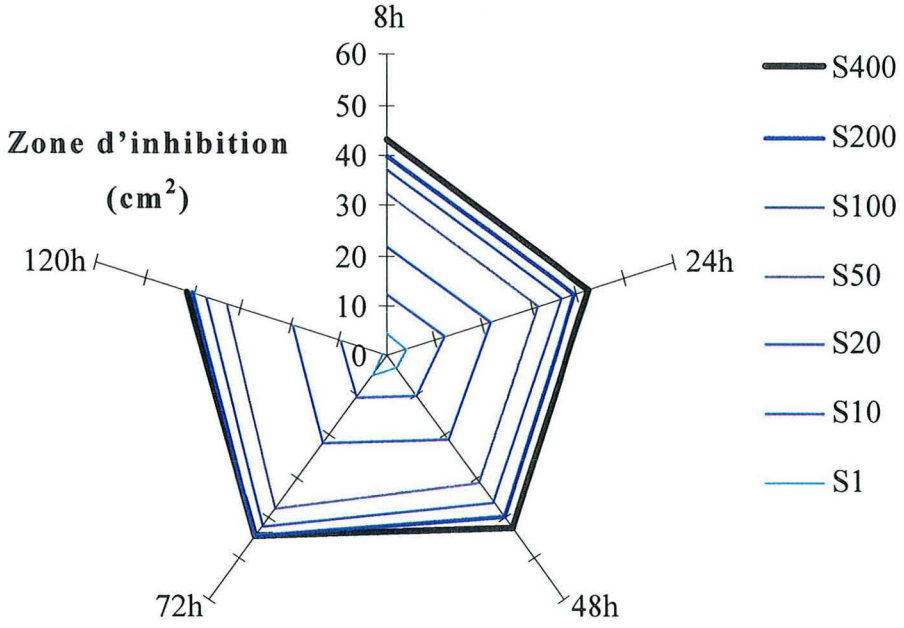


Figure 66 : zones d'inhibition obtenues contre *Listeria monocytogenes* avec des quantités croissantes de glucose et de thiocyanate de potassium encapsulés, glucose oxydase (1 mg/l) et lactoperoxydase (35 mg/l) ajoutées dans la masse, écart-type moyen = 1.9

Il apparaît que dès les plus faibles concentrations en substrats, le système est actif contre *Listeria monocytogenes*. Avec les concentrations de base (S_1), une bactériostase de 72h est obtenue. Au-delà, la zone est recolonisée par la souche (Figure 66). Lorsque les quantités de glucose et de thiocyanate augmentent, la surface inhibée s'accroît pour devenir maximale à 400 fois S_1. Dès 10 fois les concentrations initiales (S_{10}), l'effet contre *Listeria monocytogenes* est bactéricide.

La progression de la surface inhibée n'est pas proportionnelle aux quantités de glucose et de thiocyanate ajoutées. En effet, la distance entre les différentes zones diminue pour devenir presque négligeable aux fortes concentrations (Figure 66). L'effet est limité dans l'espace probablement par la diffusion des substrats dans le milieu gélosé.

VI.1.3. Substitution du thiocyanate par de l'iodure de potassium (SI)

Comme précédemment, les surfaces des zones d'inhibitions sont calculées et reportées sur la figure suivante (Figure 67).

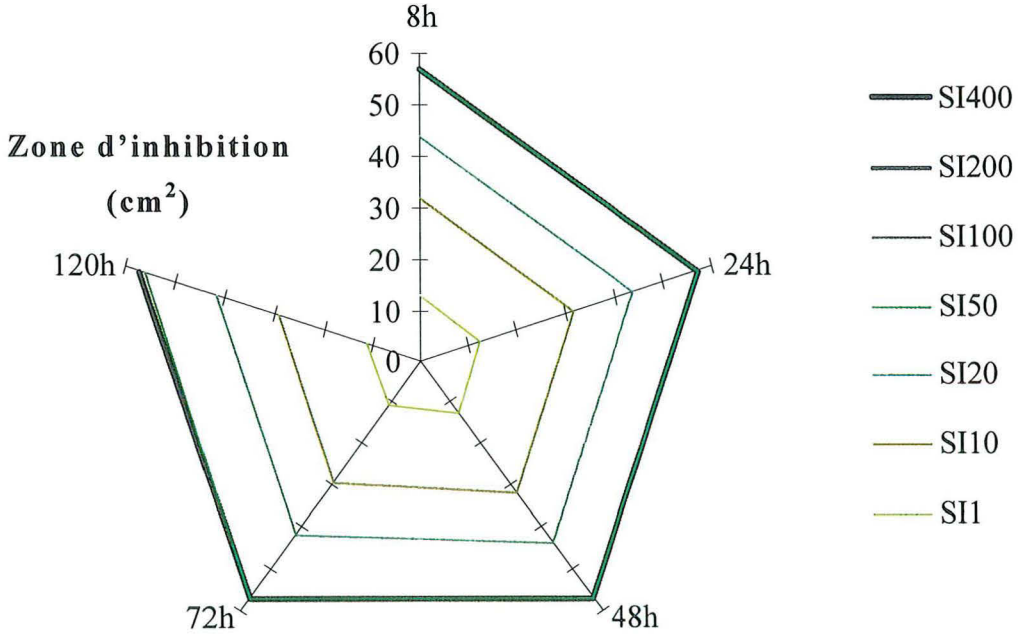


Figure 67 : zones d'inhibition obtenues contre *Listeria monocytogenes* avec des quantités croissantes de glucose et d'iodure de potassium encapsulés, glucose oxydase (1 mg/l) et lactoperoxydase (35 mg/l) ajoutées dans la masse, écart-type moyen=1

Lorsque l'iodure de potassium est utilisé, une bactéricidie est obtenue dès les plus faibles concentrations en substrats (Figure 67). L'effet est proportionnel aux quantités de glucose et d'iodure déposées jusqu'à 20 fois les concentrations initiales (SI_{20}). Ensuite, l'inhibition s'étend à la totalité de la surface de la boîte de Petri, il n'est donc, matériellement, plus possible de visualiser les différences. La surface inhibée avec SI_1 est équivalente à celle obtenue avec S_{10}.

Plusieurs travaux ont démontré, l'accroissement de l'activité bactéricide et fongicide du système LP, lorsque KSCN est substitué par KI (Aune & Thomas, 1977 ; Thomas, 1985, Bosch *et al.*, 2000 ; Revol-Junelles *et al.*, 2001). Ces résultats sont donc en accord avec ces travaux réalisés en milieu liquide.

L'effet antibactérien dû à la production de peroxyde d'hydrogène est négligeable comparé à celui obtenu avec le LPS. A 400 fois la concentration initiale en glucose (SH_{400}), l'effet est assimilable à celui obtenu avec S_{10} ou avec SI_1. Les résultats obtenus en présence du système complet (S ou SI) sont donc la conséquence de l'activation de la lactoperoxydase par l'H_2O_2 produit par le biais de la glucose oxydase. Par conséquent, la lactoperoxydase et la glucose oxydase peuvent utiliser les substrats préalablement encapsulés dans une matrice de gomme acacia.

VI.2. DETERMINATION DES QUANTITES D'ENZYMES EN VUE DU PELLICULAGE

Afin d'optimiser la réalisation de la microbille, une étude préalable a été menée pour déterminer les concentrations en lactoperoxydase et en glucose oxydase, permettant d'obtenir le compromis entre les quantités employées et l'efficacité obtenue.

A 35 mg/l, la lactoperoxydase est en excès, c'est pourquoi lors de la première série d'expériences, seule la concentration en glucose oxydase varie, de 0.1 à 1 mg/l. Ces essais ont été effectués avec la composition S_{100}, SI_{100} ou SH_{100}.

VI.2.1. Influence de la concentration en glucose oxydase (GOD)

La production de peroxyde d'hydrogène par la glucose oxydase est un paramètre important à maîtriser. En effet, un équilibre doit être trouvé entre l'activation et l'inhibition de la lactoperoxydase tout en maintenant un effet antibactérien négligeable en absence de thiocyanate. Des concentrations en GOD de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 et 1 mg/l ont été ajoutées dans la masse avec une concentration en LPO (35 mg/l) et une quantité de substrats constantes.

- LPS « TEMOIN » (SH)

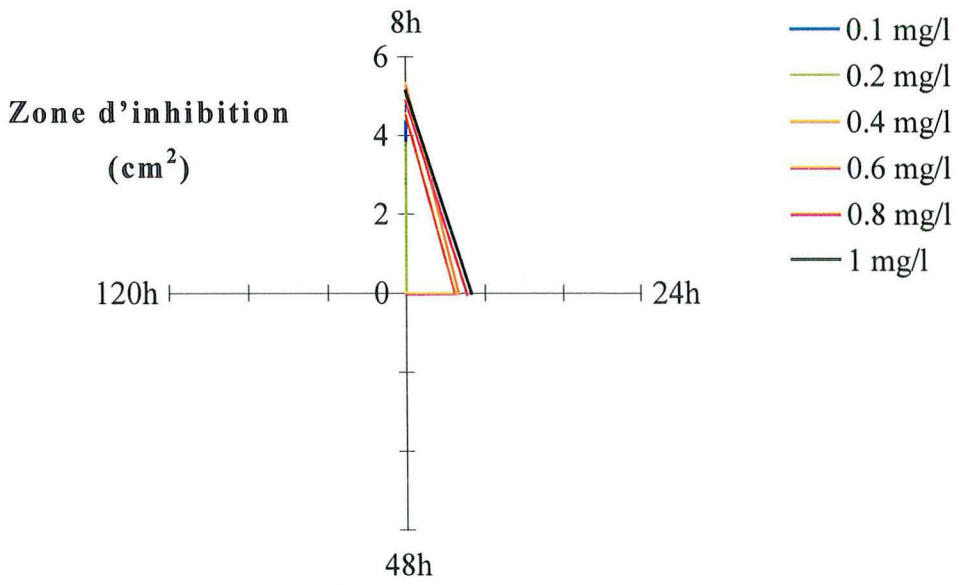


Figure 68 : influence de la concentration en glucose oxydase (GOD) sur la zone d'inhibition obtenue contre *Listeria monocytogenes* en présence du système témoin (SH_{100}), écart type moyen = 0.43

En absence de substrat pour la lactoperoxydase, l'effet obtenu est systématiquement bactériostatique sur 8h pour les plus petites concentrations, 0.1 à 0.2 mg/l, et sur 24h pour les autres, 0.4 à 1 mg/l (Figure 68). Sachant que l'écart type moyen de ces mesures est égal à 0.43, les surfaces des zones d'inhibition à 8h, sont indépendantes de la quantité de GOD ajoutée (Figure 68). L'effet de la concentration est donc surtout visualisable sur la durée de la bactériostase.

- LPS « CLASSIQUE » (S)

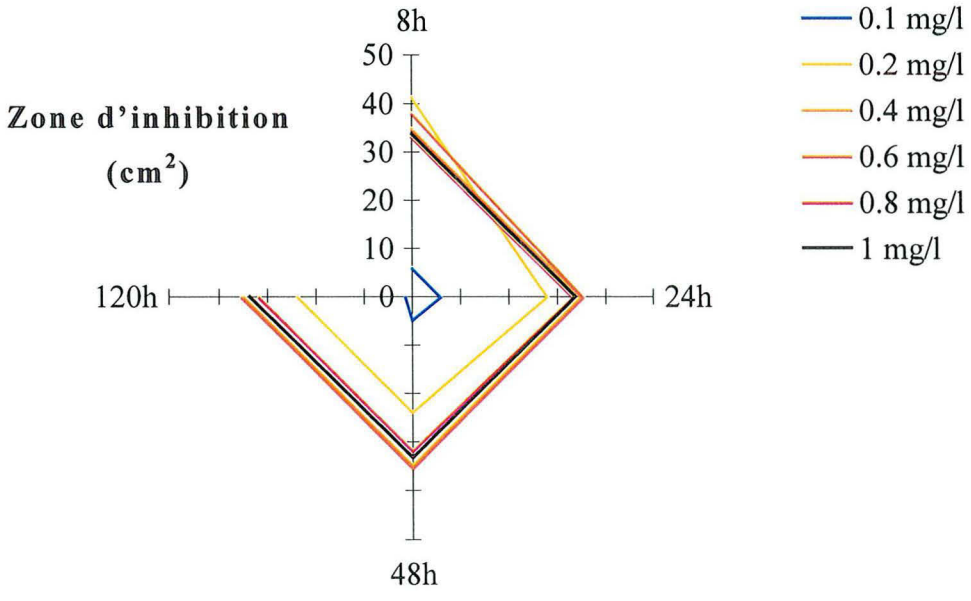


Figure 69 : influence de la concentration en glucose oxydase (GOD) sur la zone d'inhibition obtenue contre *Listeria monocytogenes* en présence du système « classique » (S_{100}), écart type moyen = 1.09

A 0.1 mg/l de GOD, l'effet du LPS est transitoire et très limité. Lorsque la concentration passe de 0.2 à 0.8 mg/l, l'inhibition observée à 8h est similaire à celle en présence de 1 mg/l, mais l'effet est bactériostatique car une repousse apparaît systématiquement dans la zone d'inhibition (Figure 69). Une concentration de 1 mg/l en GOD est donc nécessaire pour obtenir un effet bactéricide contre *Listeria monocytogenes* en présence de lactoperoxydase à 35 mg/l. Si la concentration en glucose oxydase est plus faible, la quantité de peroxyde d'hydrogène produite n'est pas suffisante pour permettre une bonne activation du système LP.

- LPS « SUBSTITUE » (SI)

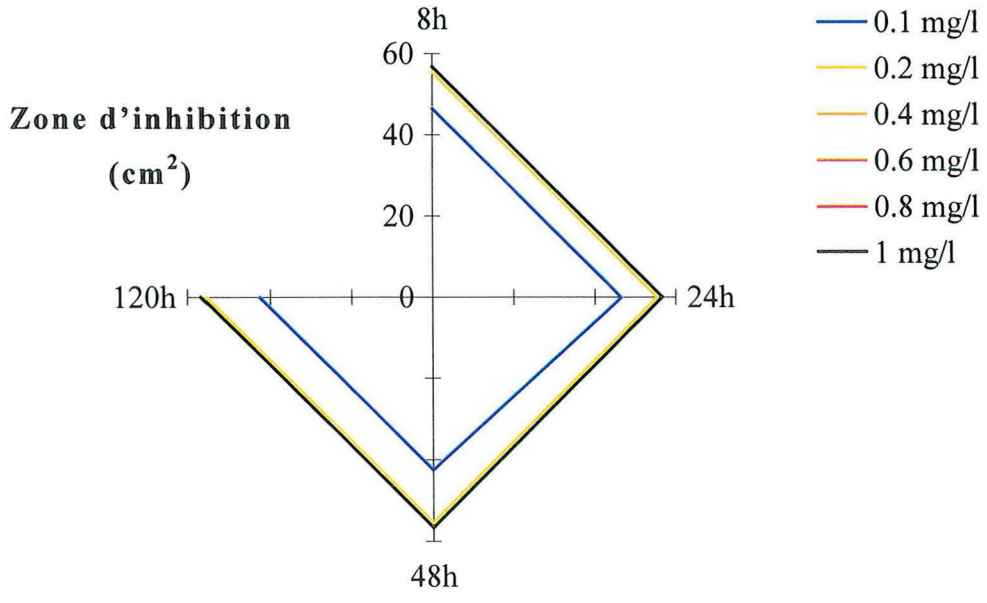


Figure 70 : influence de la concentration en glucose oxydase (GOD) sur la zone d'inhibition obtenue contre *Listeria monocytogenes* en présence du système « substitué » (SI_{100}), écart type moyen = 0.59

A 0.1 mg/l de GOD, un effet bactériostatique de 48h est obtenu contre *Listeria monocytogenes*. Au-delà, la production d'hypoiodite est suffisante pour inhiber toute la surface de la boîte (Figure 70). Par conséquent, lorsque l'iodure de potassium est substitué au thiocyanate de potassium, de très faibles concentrations en glucose oxydase sont nécessaires pour obtenir une bactéricidie.

En conclusion, avec le système « classique », une concentration en glucose oxydase de 1 mg/l est nécessaire pour obtenir une bactéricidie contre *Listeria monocytogenes*. Lorsque I^- est utilisé, à cette concentration, la GOD est en excès puisque 0.2 mg/l suffisent pour inhiber définitivement *L. monocytogenes*. Dans tous les cas, l'effet antibactérien dû à la production de peroxyde d'hydrogène est toujours négligeable à celui du LPS.

VI.2.2. Optimisation des concentrations en enzymes

Dans le paragraphe précédent, les expériences ont été réalisées avec une concentration en lactoperoxydase fixe. Pour trouver les rapports de concentrations LPO/GOD et enzymes/substrats optimaux, un plan d'expérience a été réalisé en tenant compte des différentes variables. Cet outil informatique permet de déterminer un domaine de concentrations optimales en prenant en considération les interactions entre les facteurs.

Malheureusement, les différentes expériences réalisées n'ont pas permis de définir des concentrations en glucose oxydase et en lactoperoxydase optimales pour le fonctionnement du système. En effet pour les trois systèmes multienzymatiques, la faible significativité des résultats n'a pas permis de définir un domaine de concentrations valable. L'enrobage des enzymes a donc été réalisé sur la base des concentrations préalablement définies au laboratoire pour une utilisation en milieu liquide, soit 35 mg/l pour la lactoperoxydase et 1 mg/l pour la glucose oxydase.

Cependant, les résultats obtenus ont mis en évidence l'importance de la diffusion des substrats sur l'expansion de la zone d'inhibition. Ce phénomène avait déjà été remarqué lors de l'étude de l'efficacité antibactérienne des systèmes utilisant les substrats encapsulés (VI.1.2). C'est pourquoi une étude plus précise de la diffusion du glucose et du thiocyanate s'imposait.

VI.2.3. DIFFUSION DU GLUCOSE ET DU THIOCYANATE DANS LA GELOSE

Pour mettre en évidence les limitations diffusionnelles préalablement évoquées, la diffusion du glucose et du thiocyanate dans un milieu TSAYE à 8 g/l, est étudiée. Des dosages spectrophotométriques du glucose et du thiocyanate sont réalisés, au cour du temps, à partir de petits disques de gélose prélevés en différents point d'une boîte de Petri. Ces prélèvements sont effectués à 1, 2, 3 et 4 cm du centre de la boîte et sont appelés respectivement position 1, 2, 3 et 4 (Figure 71).

La position 1 correspond, à peu près, à la zone d'inhibition maximale obtenue avec le système « témoin » (SH) et la position 3 à celle obtenue avec les plus fortes concentrations en substrats pour le système « classique » (S).

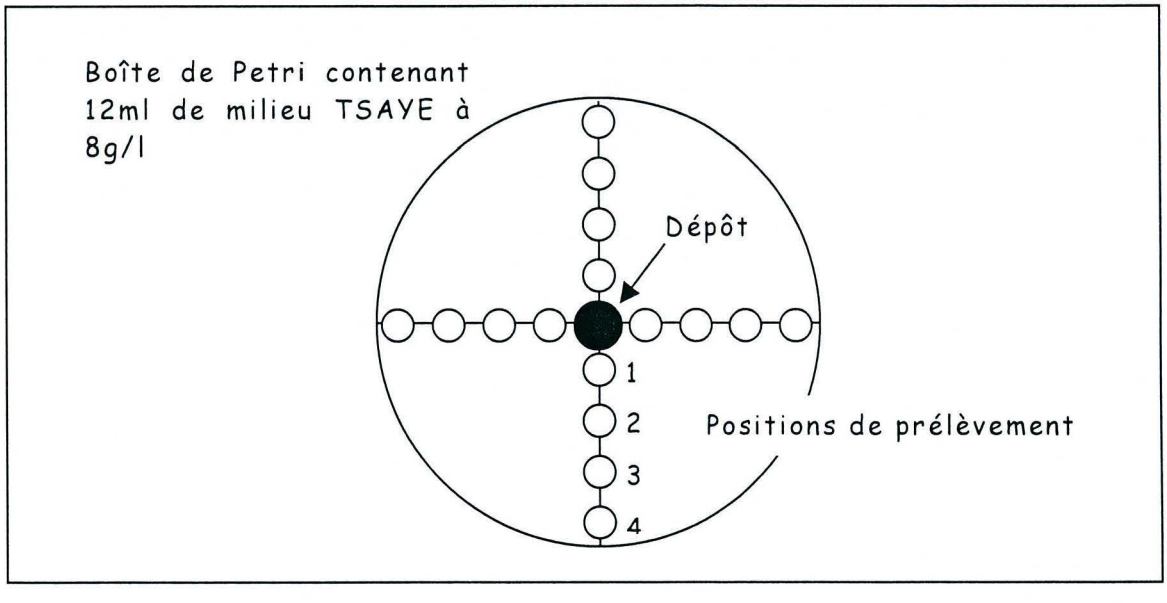


Figure 71 : protocole de suivi de la diffusion du glucose et du thiocyanate dans un milieu gélosé TSAYE à 8g/l

- SUIVI DE LA DIFFUSION DU THIOCYANATE

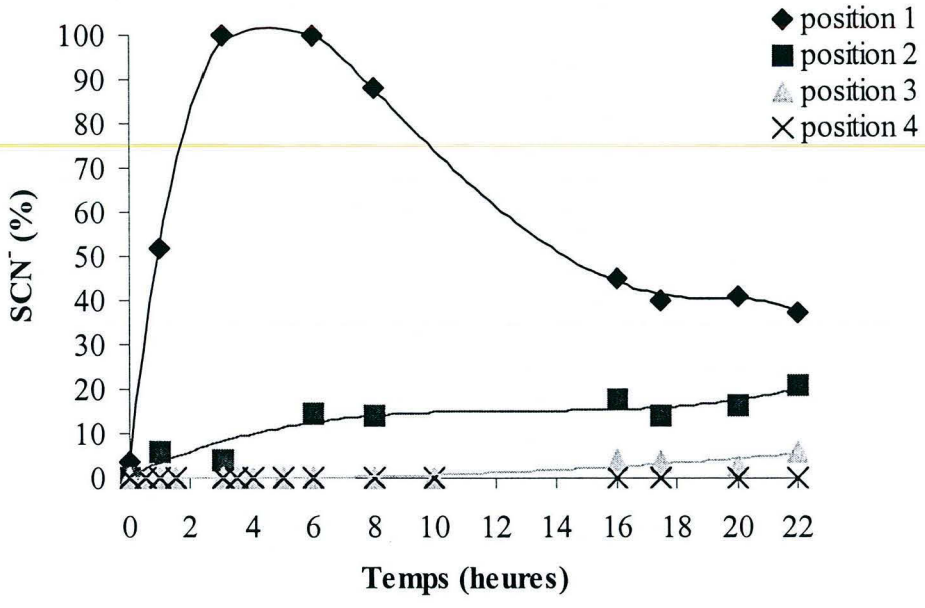


Figure 72 : évolution de la concentration en thiocyanate au cours du temps, en différentes positions dans la gélose

La concentration théorique en thiocyanate est de 16 g/l. En 4h, la totalité de SCN^- est détectée au niveau du dépôt (Figure 72). Cette première partie de la courbe correspond à la dissolution de la microbille au contact de la gélose. La gomme acacia ne piège pas de thiocyanate, ses résultats corroborent les études de dissolution réalisées précédemment.

Après 6h de diffusion, la concentration en thiocyanate au niveau du dépôt (1) diminue pour augmenter en position 2. Après 16h, SCN^- apparaît en position 3 en très faibles quantités. Ensuite, il n'est plus détecté à la périphérie de la boîte probablement parce que la concentration est passée en dessous du seuil de détection de la méthode de dosage. Après 22h de diffusion, près de 40% du thiocyanate reste encore au centre de la boîte (Figure 72).

Le thiocyanate ne diffuse pas librement dans le milieu gélosé car il n'y a pas d'équilibration de la concentration. Les limitations diffusionnelles du milieu entraînent la mise en place d'un gradient de concentration. Les zones d'inhibitions mesurées lorsque le thiocyanate est utilisé, comme substrat pour la lactoperoxydase, excèdent très rarement cette position 3. Il est possible de corréler cette absence d'expansion de la zone d'inhibition à une diffusion limitée de SCN^-. Dans la zone périphérique de la boîte, la concentration en SCN^- devient insuffisante pour permettre la production de suffisamment d'hypothiocyanite et inhiber la croissance de la souche. Cependant, l'intérêt de ce phénomène est la concentration du substrat dans une zone restreinte au niveau du dépôt, le rendant ainsi disponible pour les enzymes qui, du fait de leur taille, ne diffuseront pas.

- *SUIVI DE LA DIFFUSION DU GLUCOSE*

Comme pour le thiocyanate, un dépôt de glucose encapsulé dans la gomme acacia est réalisé au centre d'une boîte de Petri. Des prélèvements successifs sont effectués et le glucose est dosé par spectrophotométrie.

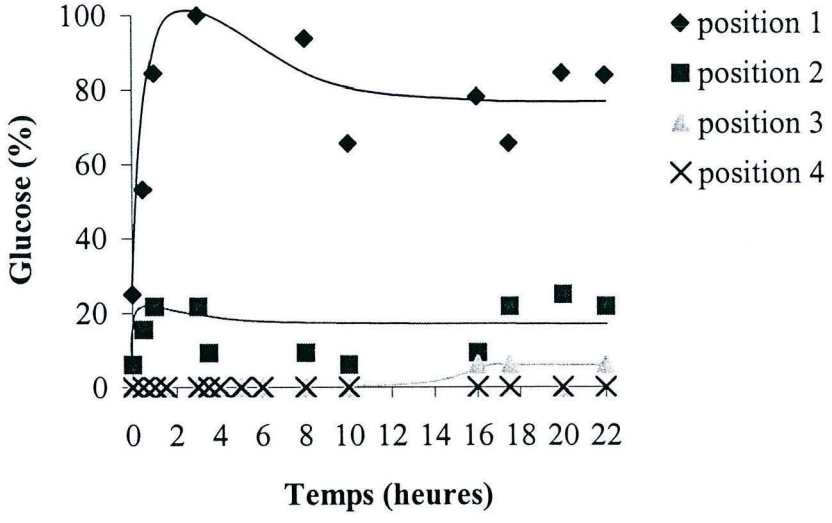


Figure 73 : évolution de la concentration en glucose au cours du temps, en différents point de la gélose

La concentration théorique en glucose est de 80 mg/l. En 6h, 100% du glucose est retrouvé en position 1. Il ne reste donc pas piégé dans la gomme acacia. Au cours du temps, la quantité de glucose au centre de la boîte diminue. Le glucose diffuse dans la gélose. Après 16h, il est détectable en position 3. Comme pour le thiocyanate, il n'est pas possible de doser le glucose à la périphérie de la boîte. Après 22h, la concentration résiduelle, au centre de la boîte, reste élevée, de l'ordre de 80% (Figure 73). Seule une petite partie du glucose diffuse dans la gélose. Sa capacité à diffuser est donc plus faible que celle du thiocyanate.

La diminution de la quantité de glucose dosée au centre de la boîte est la preuve que le glucose diffuse dans un milieu gélosé TSAYE à 8 g/l. Cependant, comme pour le thiocyanate, l'équilibration des concentrations n'est pas atteinte après 22h de diffusion. Suite à ces limitations diffusionnelles, la majorité du glucose reste au niveau de la zone de dépôt entraînant la création d'un fort gradient de concentration entre le centre et la périphérie de la boîte de Petri.

Le suivi de la concentration en glucose et en thiocyanate, au cours du temps, en différentes positions d'une boîte de Petri contenant du TSAYE à 8g/l, a mis en évidence la capacité de ces deux substrats à diffuser. Le thiocyanate semble diffuser plus facilement que le glucose. Mais dans les deux cas, la diffusion n'est pas libre car les concentrations ne s'équilibrent jamais dans toute la boîte. La mise en place de ce gradient de concentration permet de contrôler l'activation du système. En effet, lorsque la glucose oxydase et la lactoperoxydase seront immobilisées sur le noyau, leur diffusion dans le milieu sera très faible. Il est donc important que les substrats restent en quantités suffisantes à proximité de la zone de dépôt afin d'obtenir un taux de conversion maximum et limiter les pertes.

VII. EFFICACITE ANTI-*LISTERIA* DES MICROBILLES DE LPS

Toutes les compositions de noyaux n'ont pas été retenues pour le pelliculage. Les expériences réalisées précédemment, nous ont conduit à accepter comme négligeable l'effet antibactérien dû à la libération de peroxyde d'hydrogène. Les enzymes n'ont donc pas été pelliculées sur les noyaux du type SH. Pour le LPS « classique » et le LPS « substitué », les enzymes sont pelliculées sur des noyaux S_{50}/SI_{50} et S_{200}/SI_{200}. Deux enrobages supplémentaires ont été réalisés sur les microbilles de LPS « classique » basées sur la composition S_{200}. Les caractéristiques principales de chaque microbille sont récapitulées dans les organigrammes récapitulant le déroulement de l'étude (feuille jointe ou annexe 1).

Tout d'abord, la caractérisation de l'efficacité anti-*Listeria monocytogenes* des microbilles est réalisée ainsi que l'étude de l'influence de la composition du noyau, et de la présence d'un pelliculage secondaire. Dans un second temps, un spectre d'activité sera réalisé contre 7 souches bactériennes.

VII.1. INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU NOYAU SUR L'ACTIVITE ANTI-*LISTERIA MONOCYTOGENES*

VII.1.1. MICROBILLES DE LPS « CLASSIQUE »

La surface de la zone d'inhibition obtenue contre *Listeria monocytogenes* en fonction de la composition du noyau est présentée ci dessous (Figure 74).

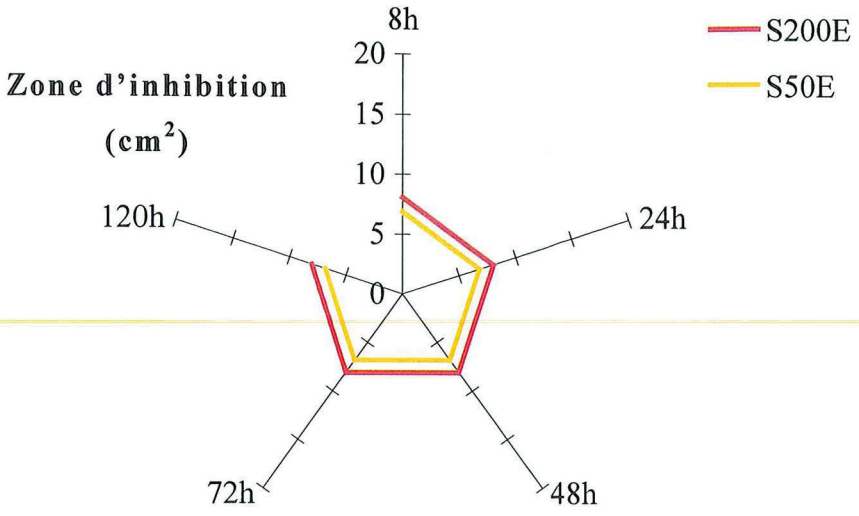


Figure 74 : influence de la concentration en substrats sur la surface de la zone d'inhibition mesurée contre *Listeria monocytogenes* avec les microbilles de LPS « classique » basées sur un noyau S_{50} ($S_{50}E$) ou S_{200} ($S_{200}E$), écart-types pour $S_{50}E$: 0.91, $S_{200}E$: 0.68

Les microbilles de LPS ont une activité bactéricide sur *Listeria monocytogenes* dès la plus faible concentration en substrats ($S_{50}E$). Les zones d'inhibition observées en fonction des concentrations en glucose et thiocyanate ne sont pas significativement différentes (Figure 74).

La présence de tous les constituants dans la microbille réduit la surface de la zone inhibée. Lorsque les enzymes sont ajoutées dans la masse, l'inhibition couvre, pour S_{50} et S_{200}, respectivement 30 et 40 cm^2 (Figure 66). Cette surface chute à moins d'une dizaine de cm^2 lorsque les enzymes sont dans la microbille (Figure 74). Les enzymes étant de grosses molécules, leur diffusion dans la gélose est limitée. Il est donc nécessaire que le produit de la réaction, $OSCN^-$, migre dans le milieu pour accroître la surface de la zone d'inhibition. Les études de diffusion ont montré qu'après dissolution de la microbille, la majorité du glucose et une partie du thiocyanate restent au niveau de la zone de dépôt. Ainsi les pertes dues à la diffusion sont limitées et les substrats sont disponibles pour les enzymes.

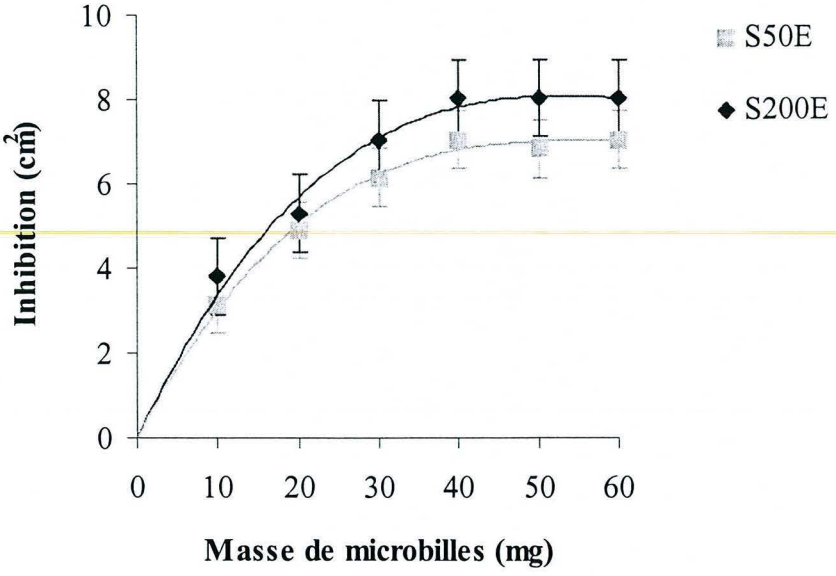


Figure 75 : évolution de la surface de la zone d'inhibition en fonction de la quantité de microbilles de LPS « classique » déposée

Si la quantité de microbilles déposées au centre de la boîte augmente, dès 40 mg de poudre déposés, il n'y a plus de proportionnalité entre la quantité de microbilles appliquée et la surface de la zone d'inhibition. Le milieu est saturé, l'addition de substrats et d'enzymes supplémentaire ne modifie plus le gradient mis en place et ne permet pas d'accroître la surface traitée.

De plus, comme précédemment, il n'y a pas de différence significative entre la surface inhibée avec $S_{50}E$ et avec $S_{200}E$ contenant 4 fois plus de substrats encapsulés (Figure 75).

Les microbilles obtenues sont actives et 10mg suffisent pour stopper définitivement la croissance de *Listeria monocytogenes*. Il semblerait que l'augmentation de la quantité de substrats dans le cœur de la microbille n'améliore pas l'efficacité de cette dernière de même que l'accumulation de microbilles au niveau de la zone de dépôt.

VII.1.2. Microbilles de LPS « substitue »

Comme pour les microbilles de LPS « classique », la surface de la zone d'inhibition obtenue contre *Listeria monocytogenes* est calculée et reportée sur la figure ci-après (Figure 76).

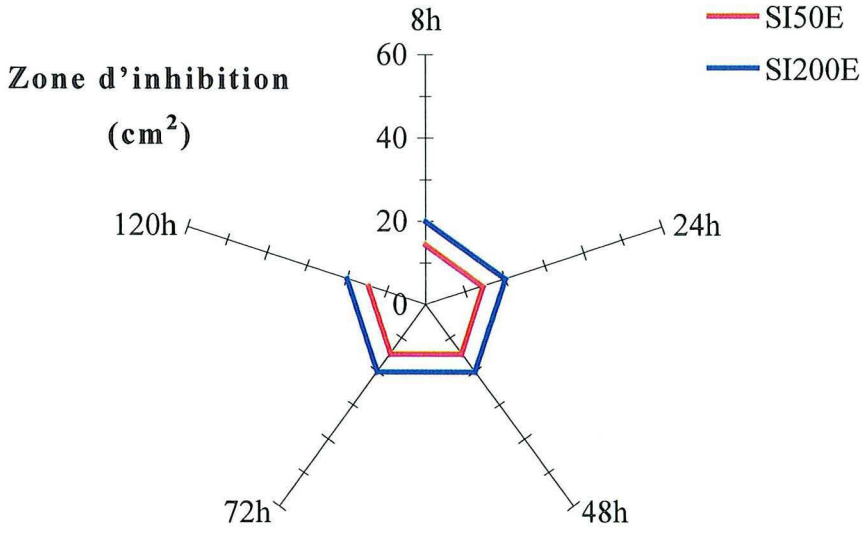


Figure 76 : influence de la concentration en substrats sur la surface de la zone d'inhibition mesurée contre *Listeria monocytogenes* avec les microbilles de LPS « substitué » basées sur un noyau SI_{50} ($SI_{50}E$) ou SI_{200} ($SI_{200}E$), écart-types pour $SI_{50}E$: 1.39, $SI_{200}E$: 2.26

Une bactéricidie est obtenue contre *Listeria monocytogenes* en présence de microbilles de LPS « substitué ». La différence de zone d'inhibition obtenue en fonction des concentrations en iodure et en glucose n'est que très faiblement significative (Figure 76).

L'activité anti-*Listeria* du système est plus marquée qu'avec les microbilles de LPS « classique ». Cependant, l'effet est très inférieur à celui obtenu lorsque les enzymes sont ajoutées dans la masse. L'addition de 50mg de SI_{50} ou de SI_{200} inhibe la totalité de la surface d'une boîte de Petri (Figure 67). Cette surface est réduite de plus de 60% lorsque les enzymes sont immobilisées dans les microbilles (Figure 76).

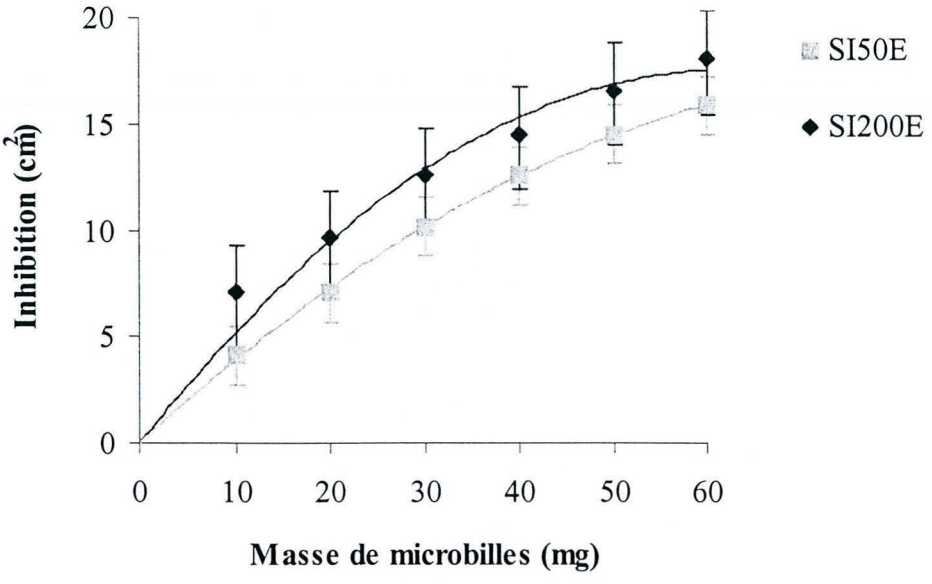


Figure 77 : évolution de la surface de la zone d'inhibition en fonction de la quantité de microbilles de LPS « substitué » déposée

Lorsque la quantité de poudre déposée varie de 10 à 60 mg, la surface d'inhibition augmente proportionnellement pour les microbilles $SI_{50}E$ (Figure 77). La limitation diffusionnelle est moins marquée que pour le système « classique », ce qui est en accord avec les observations précédentes. Néanmoins, il n'existe pas de différence significative entre les surfaces des zones d'inhibition obtenues avec $SI_{50}E$ et $SI_{200}E$. Il n'y a donc pas d'influence de la concentration en substrats.

En conclusion, le pelliculage de la glucose oxydase et de la lactoperoxydase sur un noyau de substrats encapsulés dans la gomme acacia, permet d'obtenir une activité bactéricide autant en présence de thiocyanate que d'iodure de potassium. Lorsque les enzymes sont immobilisées, l'augmentation de la quantité de substrats dans le cœur de la microbille n'a pas d'effet significatif sur la surface de la zone d'inhibition obtenue. Il est cependant possible que la méthode des cercles d'inhibition ne soit pas suffisamment sensible pour mettre en évidence cette influence. Enfin, comme en milieu liquide et dans les expériences précédentes, la différence d'efficacité du système en présence de thiocyanate ou d'iodure apparaît. Les zones d'inhibition obtenues avec un système lactoperoxydasique « substitué » sont plus importantes qu'avec le LPS « classique ».

VII.1.3. Influence de la presence d'un enrobage supplementaire

Deux enrobages supplémentaires sont réalisés autour des microbilles $S_{200}E$. Le premier à base de gomme acacia conduit à la production des microbilles $S_{200}EG$. Dans un deuxième temps, ces microbilles, $S_{200}EG$, sont pelliculées de carraghénane pour former les microbilles $S_{200}EGC$.

La gomme acacia a été retenue pour stabiliser les enzymes. Le carraghénane, par sa plus faible solubilité dans l'eau, transforme la microbille en microréacteur. Les constituants sont libérés plus tardivement dans le milieu, après que la réaction soit initiée. Les propriétés différentes de ces deux polymères vont apporter de nouvelles fonctionnalités à la microbille.

L'efficacité anti-*Listeria* est testée tout d'abord avec 50 mg de microbilles puis en modifiant cette quantité entre 10 et 60 mg. L'inhibition obtenue avec les microbilles sans pelliculage secondaire ($S_{200}E$) est reportée sur le graphique afin de faciliter la comparaison.

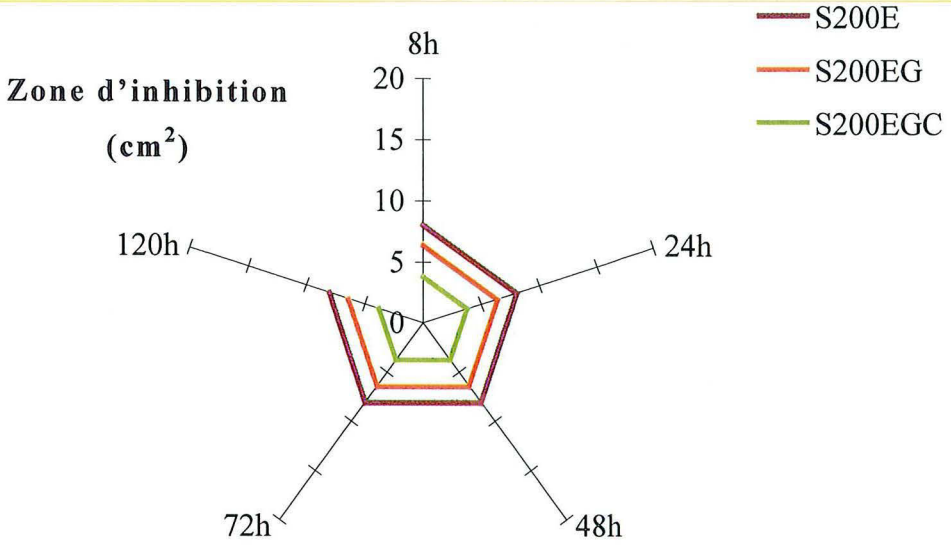


Figure 78 : influence de la présence d'un pelliculage secondaire sur la surface de la zone d'inhibition mesurée contre *Listeria monocytogenes* avec les microbilles de LPS « classique » basées S_{200} ($S_{200}E$), plus gomme acacia ($S_{200}EG$), plus carraghénane ($S_{200}EGC$), écart type pour $S_{200}E$: 0.68, $S_{200}EG$: 0.68, $S_{200}EGC$: 1

Il n'existe pas de différence significative entre la zone d'inhibition obtenue avec les microbilles $S_{200}E$ et celles après addition d'un pelliculage gomme acacia ($S_{200}EG$). A l'opposé, l'addition du pelliculage de carraghénane ($S_{200}EGC$) réduit la surface inhibée. Dans tous les cas, l'inhibition est stable, l'absence de repousse après 120h démontre l'activité bactéricide des microbilles (Figure 78).

L'addition du pelliculage de carraghénane retarde la libération des constituants de la microbille en modifiant la vitesse de dissolution. Ainsi, $OSCN^-$ est principalement produit au niveau du dépôt de microbille. Or, s'il apparaît que la concentration de l'agent antibactérien en un point, ne favorise pas l'expansion de la zone d'inhibition, il est probable que sur le long terme, l'effet soit plus marqué. Malheureusement, la méthode employée ne nous permet pas de suivre l'effet au-delà de 120h.

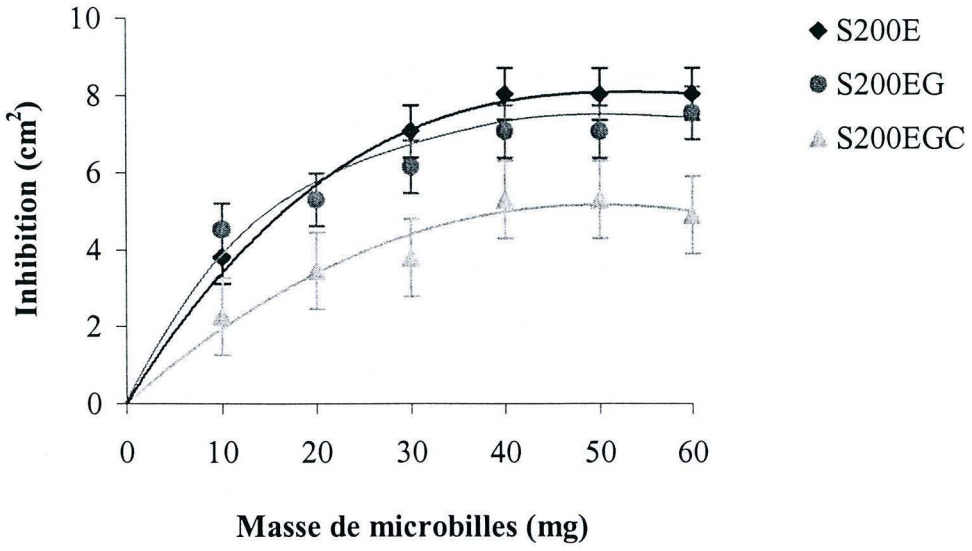


Figure 79 : évolution de la surface de la zone d'inhibition en fonction du nombre et de la nature de l'enrobage

Dès 10 mg de microbilles déposées, une inhibition remarquable est obtenue. Les microbilles $S_{200}EG$, possédant un second pelliculage de gomme acacia, inhibent une surface équivalente aux microbilles $S_{200}E$. La surface inhibée par les microbilles $S_{200}EGC$ est toujours inférieure à celle obtenue avec les deux autres compositions et ce quelle que soit la quantité de microbilles déposée (Figure 79). Jusqu'à 40 mg déposés, l'augmentation du nombre de microbilles s'accompagne de l'accroissement de la surface d'inhibition. Au delà, les trois types de microbilles présentent un phénomène de saturation. Aucune amélioration de l'effet n'est observable. Les microbilles sont donc présente en excès.

L'addition d'un enrobage de gomme acacia ne modifie pas l'efficacité anti-*Listeria monocytogenes* du système lactoperoxydasique encapsulé. Le comportement des microbilles $S_{200}EG$ et en tout point assimilable à celui des $S_{200}E$. Les microbilles pelliculées de carraghénane, $S_{200}EGC$, inhibent systématiquement une surface inférieure. Cependant, la méthode employée ne permet pas de visualiser l'effet après 120h à 37°C. Mais, il est probable que le contrôle de la libération des composé a une action intéressante sur le long terme, les microbilles pouvant être assimilées à des réservoirs de substrats.

VII.1.4. Determination statistique des comportements

Pour rechercher les microbilles présentant un comportement microbiologique similaire, les résultats précédents sont comparés et analysés statistiquement. Pour chaque composition, une analyse de la variance est exécutée sur les surfaces d'inhibition obtenues avec 50 mg de microbilles déposés (Tableau 31).

Types	*Moyennes*	*Groupes homogènes*		
$SI_{50}E$	14.89		B	
$SI_{200}E$	18.04	A		
$S_{50}E$	7.73		C	
$S_{200}E$	8.22		C	
$S_{200}EG$	6.77		C	
$S_{200}EGC$	4.3			D

Tableau 31 : A, B, C et D : groupes homogènes déterminés par l'analyse de la variance par le test de Newman-Keuls ($P<0.05$) utilisant 1 facteur, 6 modalités et 6 répétitions (StatBox, Grimmer Logiciel version 2.5, France)

L'analyse statistique confirme la présence de 4 groupes homogènes (Tableau 31). Les trois compositions $S_{50}E$, $S_{200}E$ et $S_{200}EG$ appartiennent au même groupe statistique. Avec la méthode des cercles d'inhibition, les microbilles de LPS « classique » ne sont pas différentiables même lorsque la concentration en substrats est multipliée par 4. L'addition d'un pelliculage de gomme acacia ne modifie pas l'efficacité antibactérienne du système encapsulé.

Contrairement à l'interprétation réalisée précédemment, l'analyse statistique révèle une différence d'activité antibactérienne entre les microbilles de LPS « substitué », $SI_{50}E$ et $SI_{200}E$ (Tableau 31). Globalement, lorsque la concentration en substrats est multipliée par 4, la surface d'inhibition est augmentée d'1/3.

Enfin, l'ajout du pelliculage de carraghénane ($S_{200}EGC$) aboutit à la réalisation de microbilles au comportement singulier (Tableau 31). L'effet antibactérien est moins important que pour les autres compositions mais la libération contrôlée de l'agent antibactérien peut avoir d'autres répercussions que la méthode des cercles d'inhibition ne permet pas de visualiser.

Après pelliculage, 4 types de microbilles ont donc été mis au point, deux à partir du système multienzymatique « classique », faisant intervenir du thiocyanate, et deux à partir du système « substitué » à base d'iodure de potassium. Cependant, la comparaison des résultats obtenus lors des tests des noyaux seuls (VI.1) et ceux des microbilles est difficile. Quelque soit la composition, les surfaces inhibées ont chuté de plus de moitié. L'influence de la quantité de substrats apportée n'est plus visualisable pour les microbilles basées sur le modèle « classique ». Il semblerait que la méthode des cercles d'inhibition ne soit pas adaptée à l'étude de l'activité de nos systèmes encapsulés. Un ajustement de la méthode est donc testé. Pour limiter les limitations dues à l'établissement d'un gradient de concentration stable, les microbilles sont désormais saupoudrées à la surface de la boîte test.

VII.2. SAUPOUDRAGE DES MICROBILLES

L'adaptation de la méthode des cercles d'inhibition est réalisée avec les microbilles $S_{200}E$.

Deux types de saupoudrage sont testés :

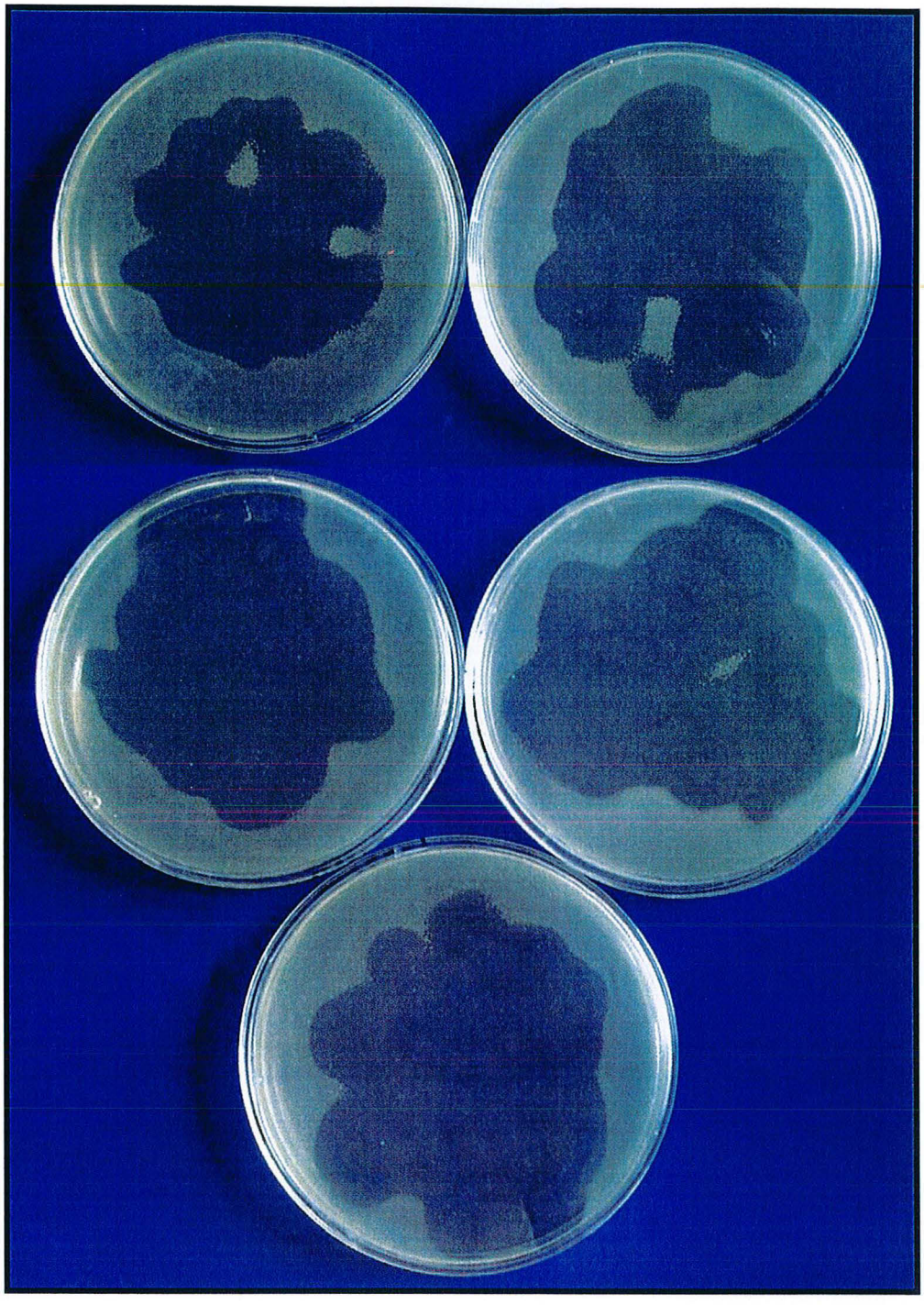
✧ avec 10 à 50 mg de microbilles sur toute la surface d'une boîte de Petri

✧ avec 50 mg de poudre contenant des fractions croissantes de microbilles $S_{200}E$ diluées dans la gomme acacia

VII.2.1. SAUPOUDRAGE DE QUANTITES CROISSANTES DE MICROBILLES

Des masses de 10, 20, 30, 40 et 50 mg de microbilles $S_{200}E$ sont saupoudrées sur la surface d'une boîte de Petri contenant *Listeria monocytogenes* (Figure 80). La surface de la zone d'inhibition obtenue est calculée puis représentée en fonction de la quantité de poudre saupoudrée (Figure 81).

La surface inhibée avec 10 mg de poudre est équivalente à celle obtenue avec 50 mg (Figure 81). Les zones d'inhibitions sont stables dans le temps, l'effet est donc bactéricide. Les surfaces des zones d'inhibition sont légèrement inférieures à celle mesurées lorsque les enzymes sont ajoutées dans la masse (Figure 66). Il semble donc que les résultats précédents, obtenus avec un dépôt central, sous-estiment largement le potentiel antibactérien des microbilles.



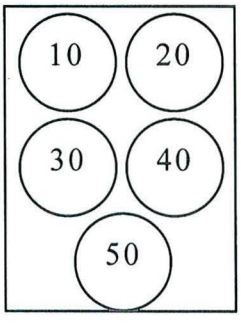


Figure 80 : photographie des surfaces d'inhibition obtenues après saupoudrage de 10 à 50 mg de microbilles $S_{200}E$

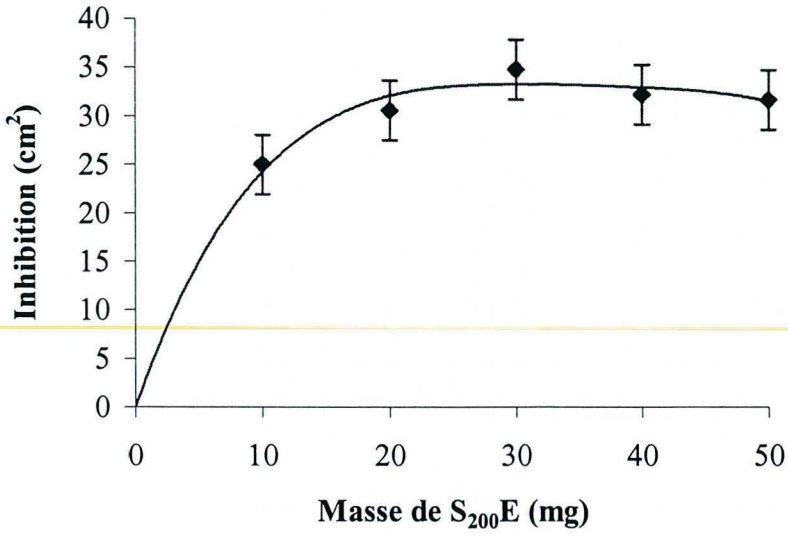


Figure 81 : évolution de la surface inhibée en fonction de la quantité de microbilles 382 saupoudrée

La zone d'inhibition mesurée, avec le saupoudrage, est donc plus représentative de l'effet antibactérien réel du système. Le saupoudrage des microbilles a mis en évidence le fort potentiel antimicrobien des microbilles. Il permet en outre, de réduire la quantité de microbilles nécessaire à l'inhibition d'une surface déterminée.

Cependant, la dispersion de très petites quantités de poudre sur une grande surface est difficile. La méthode est donc moins reproductible que lors du dépôt central. Avec 10 mg de poudre, la répartition n'est parfois pas homogène sur toute la surface, laissant des zones de croissance à l'intérieur d'une zone d'inhibition (Figure 80). Pour minimiser ce problème, les mêmes quantités de microbilles sont diluées dans de la gomme acacia afin d'obtenir une masse fixe plus importante à saupoudrer.

VII.2.2. Dilution des microbilles dans la gomme acacia (GA)

Des rapports $S_{200}E$ /GA croissants sont réalisés, 0/50, 10/40, 20/30, 40/10 et 50/0 (Figure 82). Ainsi, 50 mg de poudre sont systématiquement déposés ce qui limite les problèmes d'homogénéité de la répartition. La surface de la zone d'inhibition est calculée.

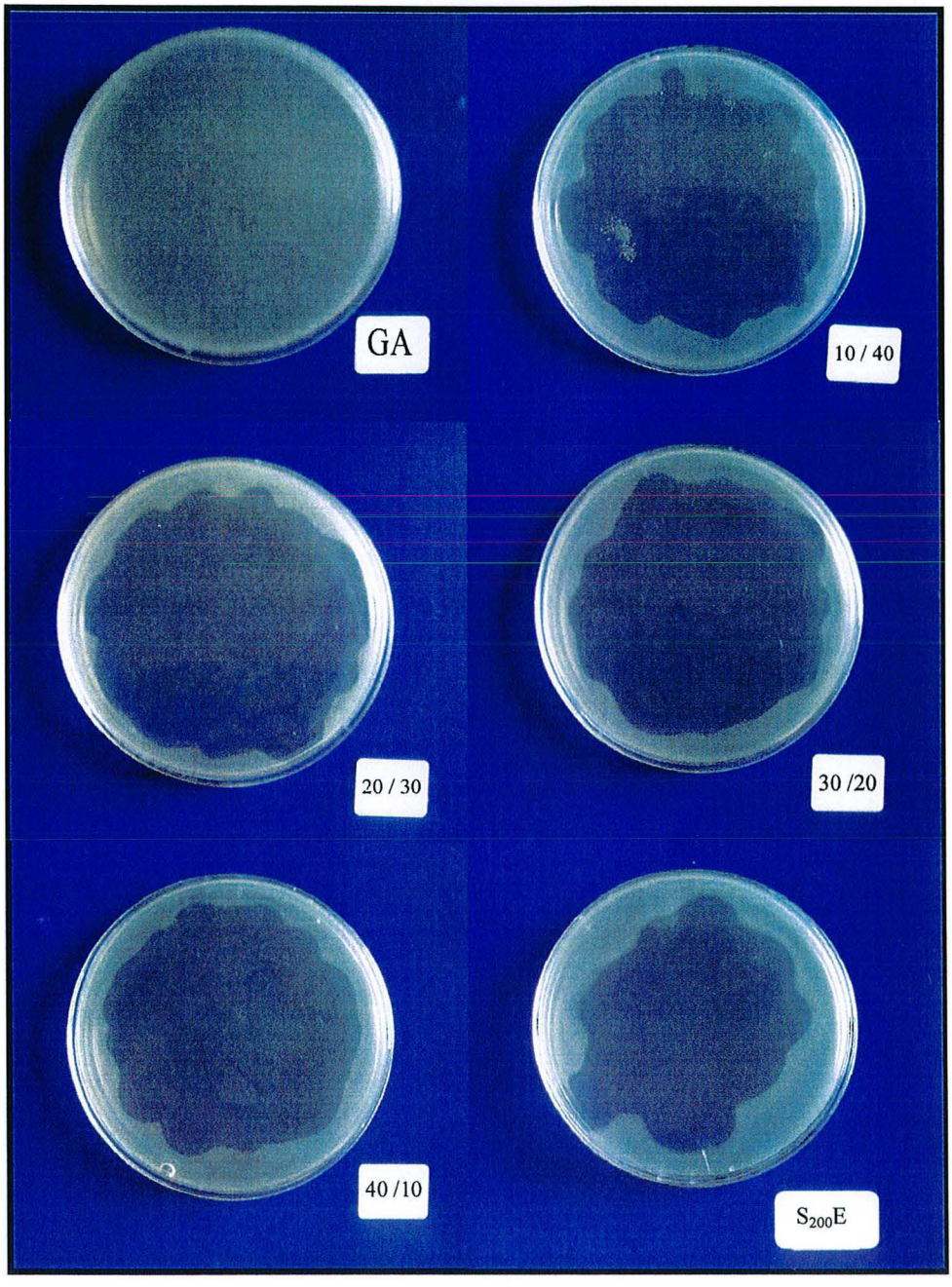


Figure 82 : photographie des zones d'inhibition après saupoudrage de 50 mg de poudre contenant différents rapports de microbilles $S_{200}E$ et de gomme acacia (382/GA)

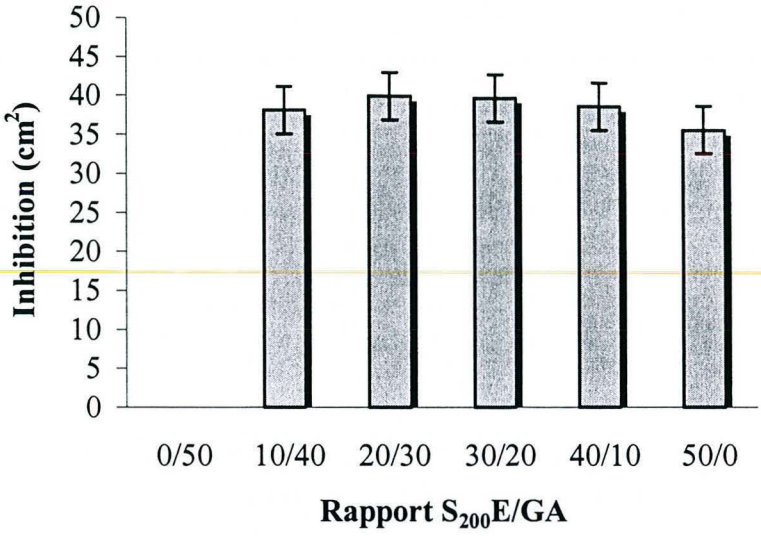


Figure 83 : évolution de la surface de la zone d'inhibition en fonction du ratio $S_{200}E$ /gomme acacia (GA)

Le saupoudrage de 50 mg de gomme acacia n'interfère pas avec la croissance de *Listeria monocytogenes*. Lorsque des quantités croissantes de microbilles $S_{200}E$ sont ajoutées à la gomme, la surface de la zone d'inhibition est constante et équivalente à la surface obtenue avec 50 mg de microbilles pures (Figure 83).

Les zones d'inhibition sont plus importantes quand les microbilles sont mélangées à la gomme probablement parce que la gomme acacia modifie l'écoulement de la poudre. Les microbilles seules ont tendance à s'agréger et lors du saupoudrage, des amas tombent à la surface de la boîte. Au contraire, lorsqu'elles sont diluées dans la gomme, la poudre est plus fluide et moins cohésive rendant la dispersion plus facile.

En conclusion, l'adaptation de la méthode des cercles d'inhibition avec la substitution du dépôt central par le saupoudrage permet de limiter significativement l'influence de la diffusion des composés sur la quantification de l'activité antibactérienne du système multienzymatique encapsulé. Les différentes expériences ont mis en évidence que 10 mg de microbilles $S_{200}E$ de LPS « classique » suffisent à inhiber la quasi-totalité de la surface d'une boîte de Petri. Cependant, la technique de saupoudrage est dépendante des propriétés d'écoulement de la poudre. Si la poudre est cohésive, la dispersion ne sera pas homogène. Les microbilles seront présentes en excès, masquant la véritable efficacité du système.

VIII. INFLUENCE DU PELLICULAGE SUR LA STABILITE DU LPS ENCAPSULE

Les travaux précédents sur l'influence d'un pelliculage supplémentaire, sur les microbilles de LPS, ont montré que :

✧ **Le pelliculage de gomme acacia** améliore légèrement le comportement rhéologique de la poudre formée par les microbilles sans modifier l'efficacité antibactérienne du système.

✧ **Le pelliculage de carraghénane** améliore l'écoulement de la poudre. Il permet de contrôler la libération des composés de la microbille ce qui, sur le cour terme, réduit la surface inhibée mais qui, à long terme, peut prolonger l'efficacité du système.

Mais l'addition d'un pelliculage sur les enzymes peut aussi augmenter leur stabilité. L'activité des microbilles $S_{200}E$, $S_{200}EG$ et $S_{200}EGC$ a donc été suivie sur plusieurs mois afin de rechercher l'impact de l'enrobage.

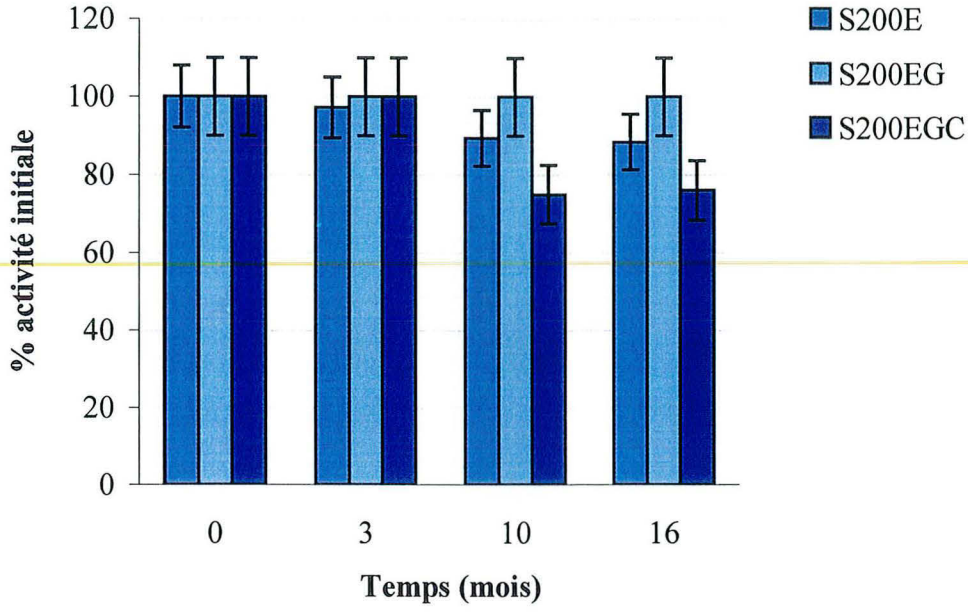


Figure 84 : activités résiduelles, en pourcentage de l'activité initiale, des microbilles de LPS en fonction de la nature et du nombre de pelliculage après stockage à température ambiante, en flacons plastiques transparents

Les microbilles réalisées présentent une bonne stabilité. Dans le pire des cas, une perte d'activité de moins de 30% peut être notée après 16 mois de conservation sans protection particulière. Les activités des trois type de microbilles sont relativement similaires et seuls des ébauches de différentiation apparaissent. Les microbilles $S_{200}EG$ apparaissent comme les plus stables car après 16 mois, aucune perte d'activité n'est notée. Les microbilles où les enzymes sont directement présentent à la surface ($S_{200}E$) amorcent une perte d'activité. Après 10 mois de conservation, la surface des zones d'inhibition devient systématiquement inférieure à celle obtenue avec des microbilles fraîches. Les dernières microbilles avec un pelliculage de carraghénane ($S_{200}EGC$) sont les plus sensibles au stockage. Après 16 mois d'observation, les zones d'inhibition mesurées deviennent significativement plus petites (Figure 84).

C'est pourquoi, pour compléter l'étude de caractérisation microbiologique, un spectre d'activité des microbilles a été réalisé contre 7 souches bactériennes communes dans les flores d'altération et de contamination des produits de la mer (Tableau 32).

Noms	*Gram*	*Catalase*
Shewanella putrefaciens	-	+
Pseudomonas fluorescens	-	+
Flavobacterium meningosepticum	-	+
Escherichia coli	-	+
Staphylococcus aureus	+	+
Salmonella enterica	-	+
Vibrio parahaemolyticus	-	+

Tableau 32 : caractéristiques des souches bactériennes retenues pour tester l'efficacité des microbilles de LPS

Ces bactéries peuvent être regroupées en 4 catégories :

✧ **Les souches Gram négative pathogènes :** *Escherichia coli* et *Salmonella*. Ce sont des entérobactéries. *Escherichia coli* est un germe témoin de contamination fécale, sa présence dans le produit est réglementée par des normes quantitatives. *Salmonella* est le 1er agent impliqué dans les TIAC (Toxi Infection Alimentaire Collective) en France. La législation impose l'absence dans 25g de produit.

✧ **Les souches Gram positive pathogènes :** *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* est le 2ème agent responsable de TIAC en France. Il est soumis à une recherche systématique et fait l'objet d'une tolérance normée. *Listeria monocytogenes*, agent pathogène aujourd'hui bien connu, est retrouvée dans plus de 20% des produits issus de la mer (Howgate, 1998).

✧ **Les souches Gram négative d'altération :** *Pseudomonas fluorescens*, *Shewanella putrefaciens* et *Flavobacterium meningosepticum* appartiennent à la flore naturelle du poisson (Gennari *et al.*, 1999).

✧ ***Vibrio parahaemolyticus*** est à classer à part car il est proche des souches Gram négative d'altération mais c'est un pathogène qui se retrouve très fréquemment dans le poisson (Howgate, 1998).

Les tests d'activité sont réalisés avec la méthode des cercles d'inhibition basée sur un dépôt central de 50 mg de microbilles. Les 3 compositions $S_{50}E$, $S_{200}E$ et $S_{200}EG$ de LPS « classique » sont testées ainsi que les deux types $SI_{50}E$, $SI_{200}E$ de LPS « substitué ».

Les résultats sont présentés après 24 et 120h d'incubation à la température optimale de croissance de la souche. La réponse à 24h témoigne de l'efficacité antimicrobienne des microbilles contre la souche. Le suivi de son évolution jusqu'à 120h permet d'apprécier le caractère bactériostatique, bactéricide ou semi-bactéricide de l'action.

Les résultats sont classés en 5 réponses, selon la surface (S) de la zone d'inhibition :

- – : $S = 0$, souche résistante
- ± : $S < 5$ cm^2, souche peu sensible
- + : $5 < S < 10$ cm^2, souche sensible
- ++ : $10 < S < 30$ cm^2, souche très sensible
- +++ : $S > 30$ cm^2, souche hyper sensible

Souches	*S50E*	*S200E*	*S200EG*	*SI50E*	*SI200E*
Sh. putrefaciens	+	+	+	+++	+++
Ps. fluorescens	+	+	+	+	++
F. meningosepticum	+	++	++	+++	+++
E. coli	+	+	+	+	++
St. aureus	+	+	+	++	+++
S. enterica	+	+	+	+	++
V. parahaemolyticus	+	+	+	+++	+++

Tableau 33 : activités antibactériennes des microbilles de LPS après 24h d'incubation à la température optimale de croissance de la souche, – : S = 0, ± : S<5 cm^2, + : 5<S<10 cm^2, ++ : 10 < S< 30 cm^2, +++ : S>30 cm^2

Souches	*S50E*	*S200E*	*S200EG*	*SI50E*	*SI200E*
Sh. putrefaciens	+	+	+	++	+++
Ps. fluorescens	±	+	+	+	++
F. meningosepticum	+	++	++	++	+++
E. coli	+	+	+	+	+
St. aureus	+	+	+	+	++
S. enterica	+	+	+	+	+
V. parahaemolyticus	+	+	+	+	+

Tableau 34 : activités antibactériennes des microbilles de LPS après 120h d'incubation à la température optimale de croissance de la souche, – : S = 0, ± : S<5 cm^2, + : 5<S<10 cm^2, ++ : 10 < S< 30 cm^2, +++ : S>30 cm^2

Toutes les souches testées sont sensibles aux LPS encapsulés car une zone d'inhibition apparaît systématiquement autour du dépôt de microbilles (Tableau 33).

Pour les microbilles de LPS « classique », $S_{50}E$, $S_{200}E$, $S_{200}EG$, composées de lactoperoxydase, glucose oxydase, glucose et thiocyanate, seul l'utilisation de *Flavobacterium meningosepticum* comme souche cible permet de mettre en évidence l'influence de la concentration en substrats. L'augmentation des quantités de glucose et de thiocyanate dans le cœur de la microbille améliore l'efficacité du système. En outre, les surfaces des zones d'inhibitions obtenues avec $S_{200}E$ et $S_{200}EG$ sont toujours équivalentes (Tableau 33). La présence du pelliculage de gomme acacia n'interfère pas avec l'activité du système.

Lorsque le thiocyanate de potassium est substitué par de l'iodure de potassium, différentes réponses apparaissent.

Shewanella putrefaciens, *Flavobacterium meningosepticum* et *Vibrio parahaemolyticus* sont plus sensibles aux microbilles $SI_{50}E$ et $SI_{200}E$ faisant intervenir l'iodure de potassium comme substrat pour la lactoperoxydase. La variation de la concentration en substrats ne modifie pas la réponse qui est, déjà avec $SI_{50}E$, très importante (Tableau 33).

Staphylococcus aureus est aussi plus sensible aux microbilles de LPS « substitué » qu'à celles de LPS « classique ». Mais contrairement aux précédentes, l'effet est plus marqué avec $SI_{200}E$ qu'avec $SI_{50}E$ (Tableau 33).

Pseudomonas fluorescens, *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* sont moins sensibles à la substitution du thiocyanate par de l'iodure. Les microbilles $SI_{50}E$ conduisent à la même réponse que les microbilles de LPS « classique ». Une légère amélioration de l'effet est obtenu seulement pour des concentrations en substrats beaucoup plus importantes (Tableau 33).

Dans une étude récente utilisant une méthode de dépôts de spots de solution antibactérienne, l'efficacité du système lactoperoxydasique est testée contre 39 souches (Cailliez-Grimal *et al.*, 2002). Cette méthode dite « des spots » est très proche de la méthode des cercles d'inhibition utilisée dans cette étude. Des dépôts de 15 µl de solution enzymatique (LPO, GOD, glucose, thiocyanate ou iodure) sont réalisés sur un milieu gélosé contenant la souche test. Parmi ces 39 souches testées, *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* et *Flavobacterium meningosepticum* sont plus sensibles à OI^- qu'à $OSCN^-$, *Vibrio parahaemolyticus* et *Shewanella putrefaciens* n'ayant pas été testés. Les autres souches présentent une réponse très similaire dans les deux cas. Ces résultats sont donc en accord avec ceux obtenus lors de l'utilisation des systèmes encapsulés.

Lorsque les temps d'incubation sont prolongés, les zones d'inhibition évoluent.

✧ **Pour le système LPS « classique » encapsulé**, les surfaces inhibées restent les mêmes pour les toutes les souches, sauf *Pseudomonas fluorescens* (Tableau 34).L'effet du système est donc bactéricide. *Pseudomonas fluorescens* est la seule bactérie à présenter un comportement différent en fonction de la quantité de substrats apportée. Les microbilles $S_{200}E$ et $S_{200}EG$ sont bactéricides et $S_{50}E$ bactériostatiques.

✧ **Avec le système LPS « substitué »**, dans la plupart des cas, les zones d'inhibition diminuent au cours du temps. Les microbilles sont bactéricides contre *Pseudomonas fluorescens* sans influence de la quantité de substrats présentes dans les noyaux. Les microbilles $SI_{200}E$ sont bactéricides contre *Shewanella putrefaciens* et *Flavobacterium meningosepticum* alors que les microbilles $SI_{50}E$ sont seulement bactériostatiques. L'effet contre *Staphylococcus aureus* et *Vibrio parahaemolyticus* est bactériostatique pour les deux compositions. Enfin, *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* voient leur croissance bloquée en présence de microbilles $SI_{200}E$ alors qu'elles sont tuées par $SI_{50}E$ (Tableau 34).

Le suivi de l'évolution de la réponse au cours du temps met en évidence une différence importante dans le fonctionnement des systèmes « substitués » et « classique ». La réponse immédiate obtenue avec un système encapsulé utilisant l'iodure de potassium est souvent beaucoup plus importante qu'avec le système « classique » contenant le thiocyanate. Cependant, l'effet est souvent plus transitoire.

Dans toutes les expériences, les surfaces inhibées avec les noyaux du type SI ou avec les microbilles $SI_{50}E$ et $SI_{200}E$ sont plus importantes. Les constituants, plus particulièrement KI et IO^-, semblent diffuser librement dans le milieu permettant un meilleur équilibre des concentrations. Le contrôle du relargage par l'encapsulation est moins important qu'avec les microbilles de LPS « classique ». Il en résulte un effet immédiat plus conséquent mais une action dans le temps moindre. La substitution d'un composé dans le noyau a donc permis la réalisation de microbilles aux propriétés antimicrobiennes mais aussi physiques différentes, apportant ainsi de nouvelles fonctionnalités

Conclusion & Perspectives

Ce travail avait pour objectif de mettre au point une formulation originale d'un complexe multienzymatique d'intérêt alimentaire, afin d'en faciliter l'emploi et favoriser son développement industriel.

Les modèles d'étude retenus sont basés sur l'association du système lactoperoxydasique à un générateur enzymatique d'H_2O_2, le couple glucose/ glucose oxydase. Trois complexes multienzymatiques ont donc été étudiés :

✧ **un complexe « témoin »** permettant de quantifier l'effet antibactérien dû à la production de peroxyde d'hydrogène. Il contient la lactoperoxydase, la glucose oxydase et du glucose ;

✧ **un complexe LPS « classique »**, constitué de lactoperoxydase, de glucose oxydase, de glucose et de thiocyanate ;

✧ **un complexe LPS « substitué »**, où le thiocyanate est substitué par de l'iodure afin de modifier l'efficacité antibactérienne du système. Il comprend donc la lactoperoxydase, la glucose oxydase, le glucose et de l'iodure de potassium.

Le modèle choisi, la mise au point de la procédure d'encapsulation s'est poursuivie par la détermination de la conformation finale des systèmes encapsulés. La formulation sèche étant la plus facile à manipuler, il a été décidé de réaliser des microbilles constituées d'un noyau contenant les substrats recouverts d'un enrobage contenant les enzymes. En plus, deux pelliculages secondaires ont été testés afin de rechercher leur influence sur les propriétés et l'efficacité antibactérienne des systèmes. Le premier pelliculage est composé de gomme acacia et le second de carraghénane. La gomme acacia a été retenue pour tenter de protéger les enzymes de la dénaturation et le carraghénane pour modifier la vitesse de dissolution des microbilles.

La réalisation de l'encapsulation de ces 3 complexes multienzymatiques s'est donc déroulée en deux étapes principales : la mise au point du noyau puis l'enrobage des enzymes.

Les premiers essais de séchage du mélange glucose/thiocyanate ont rapidement démontré la nécessité de l'addition d'un polymère inerte pour stabiliser la mixture. Pour réaliser les noyaux, trois méthodes de séchage avec production de particules ont été testées : la lyophilisation associée à un broyage du lyophilisat, l'atomisation et la granulation. Des concentrations variables de glucose et de thiocyanate ont été séchées. Ainsi, pour chaque complexe, 7 types de noyaux, présentant des rapports substrats/polymère (S/P) allant de 0.2 à 50%, ont été mis au point.

La détermination de la méthode de séchage la plus appropriée à la production des noyaux a été effectuée sur une composition intermédiaire avec un rapport S/P de 32%. Les propriétés physico-chimiques telles que la morphologie des particules, leur taille, l'humidité résiduelle des poudres formées ou la détermination de la structure chimique ont été étudiées afin de comparer les méthodes. Dans la procédure d'encapsulation, la réalisation des noyaux est une étape indépendante du pelliculage des enzymes. Les noyaux devront pouvoir être stockés, transportés et manipulés facilement, sans adaptation majeure des installations. C'est pourquoi, l'écoulement des poudres formées par les noyaux est étudié, cette propriété d'usage ayant un impact important sur l'utilisation industrielle.

La caractérisation physico-chimique a montré que les méthodes de séchage conduisent à la production de particules différentes en termes de taille, de forme et de structure chimique. L'analyse par spectrométrie infrarouge a permis d'apprécier l'efficacité de l'encapsulation matricielle des substrats dans la gomme acacia. Enfin, l'étude des cinétiques de dissolution a mis en évidence des comportements très variables vis-à-vis de l'eau. Les tests sur l'écoulement des poudres formées par les différents types de noyaux ont montré que seule la granulation permet d'obtenir des particules suffisamment grosses pour avoir un écoulement correct. Cependant, l'efficacité de l'encapsulation matricielle est beaucoup plus faible qu'avec les deux autres méthodes. Le glucose est le composant majoritaire présent à la surface des particules. Il en résulte l'apparition de phénomènes d'agrégations et de prise en masse lors du stockage.

La lyophilisation permet la production de particules présentant une grande hétérogénéité de taille et de forme. L'écoulement de la poudre est médiocre. De plus le coût du procédé associé à la nécessité d'un broyage du lyophilisat est défavorable à l'utilisation industrielle. Enfin, l'atomisation est méthode la plus facile à extrapoler à l'industrie. Le principal point négatif est la présence importante de poussières. De ce fait, la poudre a un mauvais écoulement et une tendance à fuser. Elle est facilement mise en mouvement par l'air ce qui peut poser des problèmes de santé publique et de manipulation. Toutefois, Les particules atomisées sont sphériques et l'encapsulation matricielle des substrats dans la gomme acacia est bonne. Elles présentent la plus faible cinétique de libération des substrats ce qui est intéressant pour contrôler l'activation du système enzymatique. C'est par conséquent sur un compromis entre les avantages et les inconvénients de chacune des trois méthodes qu'a été choisie l'atomisation.

C'est donc sur les noyaux obtenus par atomisation que les enrobages des enzymes ont été réalisés ainsi que ceux à base de gomme acacia et de carraghénane.

Comme pour les noyaux, les propriétés physico-chimiques des microbilles ont été étudiées sur une composition intermédiaire, de même l'influence de la présence d'un pelliculage supplémentaire sur l'écoulement de la poudre formée. Les enrobages de gomme acacia et de carraghénane améliorent significativement l'écoulement des poudres. Au contraire, l'addition seule des enzymes à la surface de la microbille favorise les interactions interparticulaires. La poudre devient plus cohésive et son écoulement mauvais.

La spectrométrie infrarouge a permis d'apprécier la qualité des pelliculages à base d'enzymes, de gomme acacia et de carraghénane et l'étude des cinétiques de dissolution ont mis en évidence le rôle de régulation que joue le carraghénane.

Les microbilles sans carraghénane ont des cinétiques de libération des substrats similaires. Par contre, le dernier type de microbilles présente une cinétique de libération contrôlée par l'enrobage de carraghénane. Les substrats sont retenus plus longtemps à l'intérieur de la microbille. L'addition de cet enrobage amène donc de nouvelles fonctionnalités à la microbille.

La dernière étape de la caractérisation des microbilles repose sur l'étude de l'activité antibactérienne des trois complexes multienzymatiques encapsulés. Les premiers tests ont été réalisés contre *Listeria monocytogenes*, puis contre 7 souches communément rencontrées dans les flores de contamination et d'altération.

Les essais réalisés avec les noyaux seuls ont montré que l'encapsulation matricielle des substrats ne limitait pas l'activation des enzymes. L'effet antibactérien dû à la production de peroxyde d'hydrogène est tout à fait négligeable. L'inhibition observée avec le thiocyanate ou l'iodure de potassium résulte donc de l'activation de la lactoperoxydase. De plus, la substitution du pseudohalogénure SCN^- par l'halogénure I^- améliore significativement l'inhibition contre *Listeria monocytogenes*. L'effet observé en milieu solide est donc bien corrélé à celui obtenu classiquement en milieu liquide.

Lorsque les enzymes sont pelliculées, les microbilles sont actives contre *Listeria monocytogenes*, et contre les sept souches bactériennes testées. L'encapsulation du LPS est donc un succès. Comme précédemment, la substitution de SCN^- par I^- améliore l'efficacité du système contre *Listeria monocytogenes*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Staphylococcus aureus*. Le pelliculage de gomme acacia n'interfère pas avec l'activité antibactérienne du système encapsulé. A l'opposé, le carraghénane réduit la surface inhibée. Mais, si elle est plus petite, la zone d'inhibition est stable dans le temps.

La méthode utilisée ne nous permet pas de suivre l'évolution des zones au-delà de 120h d'incubation. Lorsque le temps d'observation se prolonge, les conditions de croissance des souches se modifient et l'inhibition observée n'est plus seulement la résultante de la production d'agent antibactérien mais aussi de la dégradation des conditions de culture. Il serait donc intéressant d'adapter la méthode pour visualiser cette action dans le temps, par exemple, en travaillant dans une enceinte à humidité contrôlée. Cependant, dans tous les cas, la surface inhibée, avec les microbilles, est beaucoup plus petite du fait de la restriction des enzymes au niveau de la zone de dépôt.

L'adaptation de la méthode des cercles d'inhibition a mis en évidence l'intérêt du saupoudrage des microbilles afin de ne pas saturer la zone de dépôt. Le saupoudrage est d'autant plus efficace que les microbilles possèdent un enrobage autour des enzymes ou sont diluées dans une poudre inerte présentant un bon écoulement, comme de la gomme acacia. Cette dernière condition permet en plus, de réduire fortement la quantité de microbilles nécessaire à l'inhibition d'une surface donnée ainsi que le coût industriel du traitement.

Il est, d'autre part, apparu que l'addition d'un enrobage supplémentaire à celui des enzymes est nécessaire pour obtenir des particules aux propriétés satisfaisantes et que la nature de cet enrobage peut être changée, comme dans le cas du carraghénane, pour modifier les caractéristiques de la microbille. Il serait alors possible d'associer à la solution de polymère une nouvelle substance antibactérienne comme une bactériocine. Ainsi, la microbille présenterait un mode d'action en deux temps. Tout d'abord, la libération des bactériocines présentes en surface puis plus tardivement l'activation du LPS encapsulé lorsque la microbille est totalement dissoute. Le choix d'une bactériocine présentant une activité antibactérienne différente de celle du LPS, permettrait d'élargir le spectre d'action de la microbille.

En conclusion, ce travail a abouti à la réalisation d'une microbille contenant le système lactoperoxydasique et un générateur enzymatique de peroxyde d'hydrogène. Cette microbille est active contre les principales souches de contaminations et d'altérations. L'encapsulation stabilise le système qui, après plusieurs mois de stockage, conserve plus de 80% de son activité initiale. Sa formulation sous forme d'une poudre sèche facilite son emploi car le complexe devient plus aisé à manipuler. Aucun mélange préalable des constituants n'est nécessaire. Les rapports de concentrations au sein de la microbille sont modulables permettant ainsi de modifier l'efficacité antibactérienne en fonction du résultat souhaité. La poudre est dépourvue de fine et de poussière, sa manipulation n'entraîne donc pas de risque d'allergie. Son écoulement est correct permettant un emploi dans des systèmes de transport automatisés. Enfin, la réalisation à l'échelle pilote des noyaux puis des pelliculages montre que le procédé est parfaitement applicable à l'industrie.

Mais parallèlement, le concept de la microbille est intéressant car il peut facilement être appliqué à d'autres complexes multienzymatiques hydrophiles. En effet, la substitution du thiocyanate par de l'iodure de potassium montre que la microbille est modulable. La gomme acacia choisit comme matrice inerte stabilise les composés hygroscopiques. De plus, les procédés mis en œuvre sont doux et peuvent donc être appliqués à des enzymes thermosensibles.

Plusieurs améliorations peuvent cependant être réalisées.

Tout d'abord, lors de la première étape de réalisation du noyau, la poudre granulée était intéressante en termes de taille, de forme, d'humidité et d'écoulement. Cependant, sa faible encapsulation matricielle, nous a fait préférer l'atomisation comme méthode de séchage afin de limiter les problèmes d'agglomération.

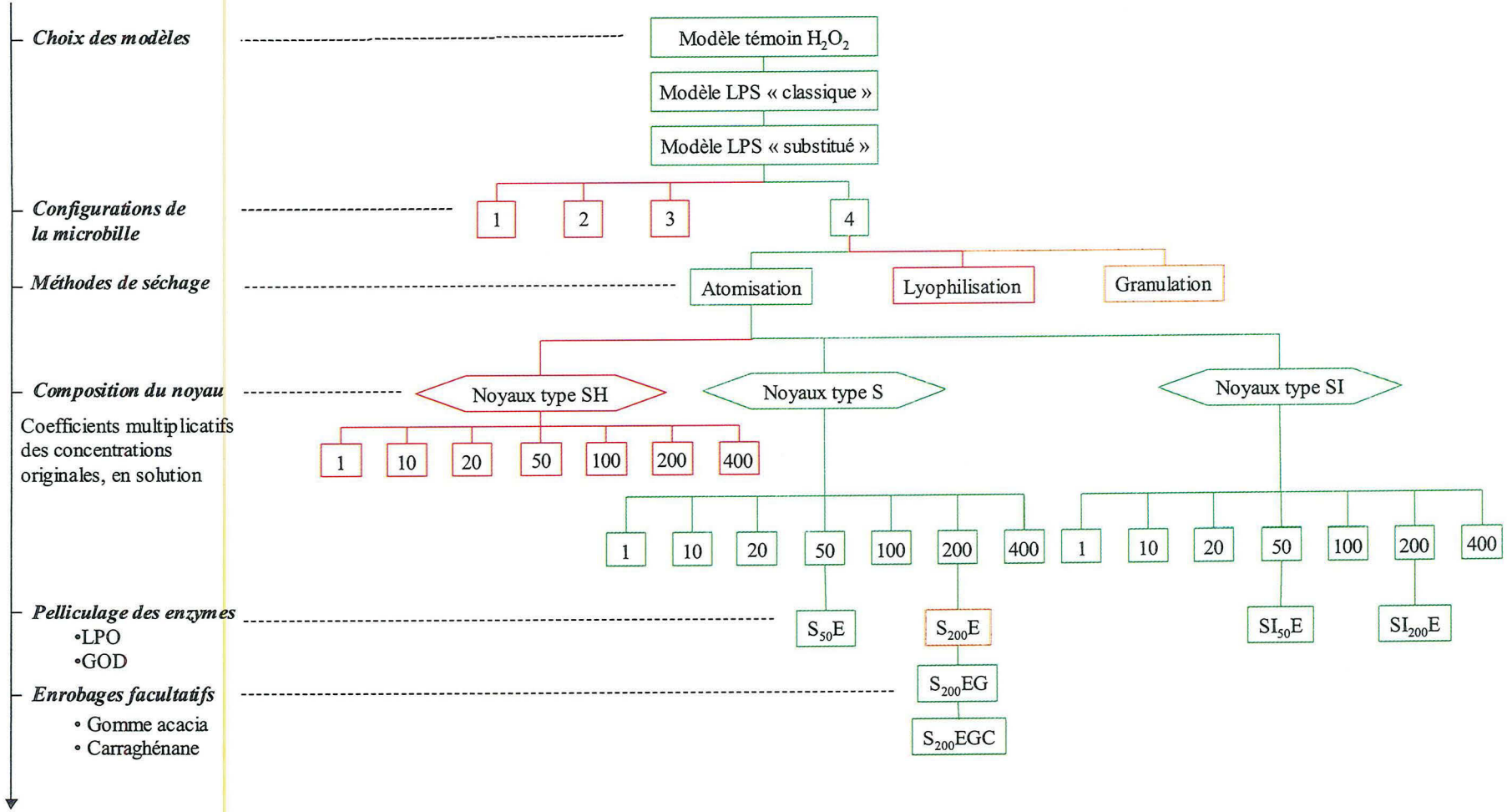
Malheureusement, la poudre atomisée présente un défaut majeur de par la petite taille des particules constitutives et la présence importante de poussière. Il pourrait donc être intéressant d'utiliser des sécheurs multiples effets pour produire les noyaux. Ces sécheurs combinent une phase d'atomisation à une étape de granulation en continu avec recyclage des fines. Ainsi, il serait possible de ne retenir que les points positifs de chacune des deux méthodes. La solution étant tout d'abord atomisée, l'encapsulation matricielle des substrats sera similaire à celle observée dans cette étude. Ensuite, la granulation conduira à une augmentation de la taille moyenne des particules tout en supprimant les poussières. La poudre ainsi obtenue présentera les avantages des poudres granulée et atomisée sans leurs inconvénients.

Ce travail s'est surtout intéressé à la réalisation et à la caractérisation des microbilles de LPS. Cependant, lors de l'optimisation des quantités d'enzymes en vue du pelliculage, il a été démontré qu'une concentration de 1 mg/l de glucose oxydase est excessive pour le système « substitué ». Les différents résultats de microbiologie laissent penser qu'il en est probablement de même pour la lactoperoxydase. C'est pourquoi, il serait intéressant de réaliser de nouvelles microbilles avec des quantités d'enzymes réduites. Le test de leur activité antibactérienne contre *Listeria monocytogenes* permettrait de déterminer le rapport glucose oxydase/lactoperoxydase offrant le meilleur compromis entre le coût et l'efficacité.

Enfin, les résultats obtenus sur milieu synthétique nous encouragent à réaliser des tests microbiologiques sur un modèle alimentaire. Les essais préliminaires initiés sur des filets de saumon frais sont prometteurs. Mais, la caractérisation de la qualité d'un produit alimentaire tel qu'un filet de poisson, ne se limite pas à un dénombrement de la flore bactérienne. Il serait intéressant de rechercher l'impact du LPS encapsulé sur les propriétés texturales ou organoleptiques du produit.

ANNEXE

Etapes de la mise au point de l'encapsulation des systèmes multienzymatiques modèles, témoin H2O2, LPS « classique » et LPS « substitué »



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques ...

- Abdullah E.C. & Geldart D., 1999. The use of bulk density measurements as flowability indicators. Powder Technology, 102: 151-165

- Amiet-Charpentier C., Benoit J.P., Gadille p., Richard J., 1998. Preparation of rhizobacteria-containing polymer microparticles using complex coacervation method. Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects, 144: 179-190

- Anderson D.M.W., Bridgeman M.M.E., Farquhar J.G.K., MacNab C.G.A., 1983. The chemical characterization of the test article used in toxicological studies of gum arabic (*Acacia senegal* (L.) Willd), The International tree Crops Journal, 2: 245-254.

- Anon, 1996. Bringing spices to life in soups and sauces. Food Maketing & Technology, 10 (2): 6

- Arshady R., 1993. Microcapsules for Food. Journal of Microencapsulation, 10 (4): 413-435

- Arshady R., 1999. Microspheres, Microcapsules & Liposomes, vol 1: preparation and chemical applications. Ed. Reza Arshady, Citus Books, London, United Kingdom

- Astier Dumas M., 1992. Mise au point : listérioses. Médecine et nutrition. 28 (6): 332-333

- Aune T.M. & Thomas E.L., 1977. Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. European Journal of Biochemistry, 80: 209-214

- Barrett N.E., Grandison A.S., Lewis M., 1999. Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. Journal of Dairy Research 66: 73-80

- Barry A.L., Garcia F., Thrupp L.D. 1970. An improved single-disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens. American Journal of Clinical pathology, 53 (2): 149-158

- Bergey's manuel of systematic bacteriology, 1986. Williams & Wilkins, 2: 1235-1242; 1472-1481

- Berk Z. & Dumoulin E., 1996. Spray dried and coated powders containing iron: effect on lipid oxidation. IDS'96, 10th International Drying Symposium, Krakow

- Betts R. H., Dainton F. S., 1953. Electron transfer and other processes involved in the spontaneous bleaching of acidified aqueous solution of ferric thiocyanate. Journal of American Chemistry Society, 75: 5721-5724

- Bibi W. & Backmann M.R., 1997. The fate of thiocyanate in the lactating bovine. Milchwissenschaft, 52 (1): 8-10

- Bickerstaff G.F., 1997. Immobilization of enzymes and cells, practical considerations. In "Immobilization of enzymes and cells" ed. G.F. Bickerstaff, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 1-11

- Björck L. & Rosén C.G., 1976. An immobilized two-enzyme system for the activation of the lactoperoxidase antimicrobial system in milk. Biotechnology and Bioengineering, 18 (10): 1463-1472

- Björck L., Rosén C.G., Marshall V., Reiter B., 1975. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against Pseudomonads and other gram negative bacteria. Applied Microbiology, 30 (2): 199-204

- Bosch E.H., Van Doorne H., De Vries S., 2000. The lactoperoxidase system: influence of iodide and the chemical and antimicrobial stability over the period of about 18 months. Journal of Applied Microbiology, 89: 215-224

- Boussouel N., Mathieu F., Benoit V., Linder M., Revol-Junelles A.M., Millière J.B., 1999. Response surface methodology, an approach to predict the effects of a lactoperoxidase system, nisin, alone or in combination, on *Listeria monocytogenes* in skim milk. Journal of applied Microbiology, 86 (4): 642-652

- Boussouel N., Mathieu F., Revol-Junelles A.M., Millière J.B., 2000. Effects of combinations of lactoperoxidase system and nisin on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in skim milk. International Journal of Food Microbiology, 61: 169-175

- Brouillaud A., 1996. Ecologie et épidémiologie des *Listeria* en rapport avec les aliments (exemple de la filière lait). Conférence CRIT

- Bruneton J., 1993. Polysaccharides hétérogènes dans « Phytochimie, Plantes médicinales », éd. Lavoisier, 85-89

- Burgess D.J., 1994. Complexe coacervation, microcapsule formation. In « Macromolecular complexes in chemistry and biology » Ed. Dublin P., Block J., Davis R., Schulz D.N., Thies C., Springer-Verlag Berlin: 285-300

- Cailliez-Grimal C., Revol-Junelles A.M., Linder M., Millière J.B., 2002. Antimicrobial activity spectra of glucose/glucose oxidase and the lactoperoxidase systems (SCN^-) modified by I^- or IO_3^- anion. Milchwissenschaft, ***in press***

- Carr R.L., 1965. Evaluating flow properties of solids. Chemical Engineering, 18:163-168

- Chamberlain P. & Symes K.C., 1993. Polymeric formulations of pest control agents. In "Encapsulation and Controlled Release", Ed. Karsa & Stephenson, Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park Cambridge, 131-140

- Champagne C.P., Gaudy C., Poncelet D., Neufeld R.J., 1992. *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. Applied and Environmental Microbiology, 58 (5): 1429-1434

- Chan L. W., Heng P. W. S., Wan L. S. C., 1997. Effect of cellulose derivatives on alginate microspheres prepared by emulsification. Journal of Microencapsulation, 14 (5) 545-555.

- Chang T.M.S., 1964. Semipermeable microcapsules. Science, 1: 524-525

- Communauté Economique Européenne, 1978. Directive 78/663/EEC, Journal Officiel de la Communauté Européenne, n° L223/12, 14/08/78 (Bruxelles).

- Cottrell I.W., 1977. Algin. In "Food colloids" ed. H.D. Graham, The Avi Publishing company, INC, Westport, Connecticut, 347-381

- Couarraze G. & Porte H., 1993. Procédés de microencapsulation pour la réalisation de systèmes à libération modifiée de principe actif.

- Darrington H., 1999. The power of powder. Food Manufacture, 74 (3): 31-32

- De Donato P., Kongolo M., Barres O., Yvon J., Enderle F., Bouquet E., Alnot M., Cases J.M., 1999. Chemical surface modifications of sulphides minerals after comminution. Powder Technology, 105: 141-148

- De Donato P., Cases J.M., Kongolo M., Michot L., Burneau A., 1990. Infrared investigation of amylxanthate adsorption on Galena: influence of oxidation, pH and grinding. Colloïds and Surfaces, 44: 207-228

- De Wit J.N., Van Hooijdonk A.C.M., 1996. Structures, functions and application of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. Netherlands Milks & Dairy Journal 50: 227-244

- Denis F., Ramet J.P., 1989. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in trypticase soy broth, UHT milk and French soft cheese. Journal of Food Protection, 52 (10): 706-711

- Dickinson E., 1991. Food polymers, gels and colloids. Proceeding of the International Symposium of the Food Chemistry Group of the Royal Society of Chemistry, Norwich

- Dionysius D.A., Grieve P. A., Vos A.C., 1991. Studies on the lactoperoxidase system: reaction kinetics and antimicrobial activity using two methods for hydrogen peroxide generation. Journal of Applied Bacteriology, 72: 146-153

- Dondero M., EgañaV., Tarky W., Cifuentes A., Torres J. A., 1993. Glucose oxidase / catalase improve preservation of shrimp (*Heterocarpus reedi*). Journal of Food Science. 58 (4): 774-779

- Eichler K., 2001. Trends in the European encapsulation market. Life Science today, 6: 10-11

- Fadel M. & Courtois P., 2001. Effect of lactoperoxidase-generated hypothiocyanite upon black pigmented anaerobe growth. International Journal of Molecular Medicine, 8 (1): 59-62

- Farrag S.A., El Gazzar F.E., Marth E.H., 1992. Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by the lactoperoxidase system in semi synthetic medium and raw milk. Milchwissenschaft, 47 (2): 95-97

- Ferrari R. P., Ghibaudi E. M., Travusa S., Laurenti E., De Gioia L., Salmona M., 1997. Spectroscopic and binding studies on the interaction of inorganic anions with lactoperoxidase. Journal of Inorganic Biochemistry, 68: 17-26

- Field C.E., Pivarnik L.F., Barnett S.M., Rand A.G., 1986. Utilization of glucose oxidase for extending the shelf-life of fish. Journal of Food Science, 51: 66-70

- Finch C.A., 1993. Industrial Microencapsulation: polymers for microcapsules walls. In "Encapsulation and Controlled Release", Ed. Karsa & Stephenson, Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park Cambridge, 1-12

- Food and Agriculture Organization (FAO), 1982. Specifications for Identity and Purity. Food and Nutrition Paper, n° 25: 93-95

- Frederick K.R., Tung J., Emerick R.S., Masiarz F.R., Chamberlain S.H., Vasavada A., Rosenberg S., Chakraborty S., Schopfer L.M., 1990. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of yeast derived enzyme. The Journal of Biological Chemistry, 265 (7): 3793-3802

- Garcia-Garibay M., Luna-Salazar A., Casas L.T., 1995. Antimicrobial effect of the lactoperoxidase system in milk activated by immobilized enzymes. Food Biotechnology, 9 (3): 157-166

- Gaya P., Medina M., Nunez M., 1991. Effect of the lactoperoxydase system on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperatures. Applied and Environmental Microbiology, 57 (11): 3355-3360

- Geldart D., Harnby N., Wong A.C.Y., 1984. Fluidization of cohesive powders. Powder Technology, 37 (1): 25-37

- Gennari M., Tomasselli S., Cotrona V., 1999. The microflora of fresh and spoiled sardines (Sardina pilchardus) caught in Adriatic (Mediterranean) sea and stored in ice. Food Microbiology, 16: 15-28

- Goulet V., Jacquet C., Laurent E., Rocourt J., 2001. La surveillance de la listeriose humaine en France en 1999. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire. (34)

- Graindorge P., 1992. Contribution à l'étude, par analyse des données, des modes d'action des additifs d'écoulement pulvérulents en mélange avec des poudres alimentaires. Thèse de doctorat, Nantes

- Greenblatt H.C., Dombroski M., Klishevich W., Kirkpatrick J., Bajwa I., Garrison W., Redding B.K., 1993. Encapsulation and controlled release of flavours and fragrances. In "Encapsulation and Controlled Release", Ed. Karsa & Stephenson, Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park Cambridge, 148-162

- Greenspan L., 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. Journal of Research of the National Bureau of. Standards, Section A Physics and Chemistry, 81A: 89-93

- Groboillot A., Boadi D.K., Poncelet D., Neufeld R.J., 1994. Immobilization of cells for application in the food industry. Critical Reviews in Biotechnology, 14 (2): 75-107

- Hanssen F.S., 1924. The bactericidal property of milk. British Journal of Experimental Pathology, 5: 271-280

- Haouz A., Glandières J.M., Alpert B., 2001. Involvement of protein dynamics in enzyme stability, the case of glucose oxidase. FEBS Letters, 506: 216-220

- Haouz A., 1994. Etude comparative de la glucose oxydase soluble et immobilisée. Quelques applications biotechnologiques des enzymes immobilisées. Thèse de Doctorat en Sciences, Biochimie, Paris 7.

- Hausner H.H., 1967. Friction conditions in a massive metal powder. International Journal of Powder Metallurgy, 3 (4): 7-13

- Hernandez M.C., Van Markwijk B.W., Vreeman H.J., 1990. Isolation and properties of lactoperoxidase from bovine milk. Netherlands Milk and Dairy Journal, 44: 213-231

- Hill K.J., Kaszuba M., Creeth J.E., Jones M.N., 1997. Reactive liposomes encapsulating a glucose oxidase-peroxidase system with antibacterial activity. Biochimica et Biophysica Acta, 1326: 37-46

- Hoogendoorn H., Piessens J.P., Scholtes W., Stoddard L.A., 1977. Hypothiocyanite ion: the inhibitor formed by the system lactoperoxydase-thiocyanate-hydrogen peroxide. Caries Research, 11: 77-84

- Howgate P., 1998. Review of the public health safety of products from aquaculture. International Journal of Food Science and Technology, 33: 99-125

- Hui Y.H., 1993. In "Product manufacturing dairy science and technology handbook. VCH. 2: 326-330

- Ihalin R., Loimaranta V., Lenander-Lumikari M., Tenovuo J., 1998. The effects of different (speudo)halides substrates on peroxidase-mediated killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Journal of Periodontal Research, 33: 421-427

- Jacob B. M., Essy A.K., Sreekumar B., Haridas M., 2000. Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. Life Sciences, 66 (25): 2433-2439

- Jacquet CH., Miegeville A. F., Catimel B., Huynh G., Courtieu A. L., Rocourt J., 1994. La listériose humaine en France en 1991, 1992 et 1993. Bilan à partir des souches adressées aux centres nationaux de référence. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire. (28) : 123-125

- Jones M.N., Hill K.J., Kaszuba M., Creeth J.E., 1998. Antibacterial reactive liposomes encapsulating coupled enzyme systems. International Journal of Pharmaceutics, 162:107-117

- Kamau D.N., Doores S., Pruitt K.M., 1991. Activation of the lactoperoxidase system prior to pasteurization for shelf-life extension of milk. Millchwissenschaft. 46 (4): 213-214

- Kebary K.M.K., Hussein S.A., Badawi R.M., 1998. Improving viability of bifidobacteria and their effect on frozen ice milk. Egyptian Journal of Dairy Sience, 26 (2): 319-337

- Kester J.J., Fennema O.R., 1986. Edible films and coatings: a review. Food Technology, 12 : 47-59

- Kind M., 1999. Product engineering. Chemical Engineering and Processing, 38: 405-410

- King A.H., 1995. Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing on hydrocolloids. In ACS Symposium Series 590: encapsulation and controlled release of food ingredients. American chemical Society, chap.3: 26-39

- King A.H., 1983. Brown seaweed extracts (Alginates). In "Food Hydrocolloïds" vol. 2, ed. M. Glicksman, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, p. 151

- Kohler H. & Jenzer H., 1989. Interaction of lactoperoxidase with hydrogen peroxide, formation of enzyme intermediates and generation of free radicals. Free Radical Biology & Medecine. 6: 323-339

- Kouadri–Henri A., Azema N., Benhassaine A. 1999. Flowability of a mixture of two powders obtained by co-grinding, mixing and surface treatment. Powder technology, 10 (3): 37-43

- Kravtchenko T.P., 1996. application of acacia gum as a source of soluble dietary fibre. Proceedings of the FIE Seminar on Functional Foods, 12-14 Nov, Paris, CNI France

- Kussendrager K.D., Van Hooijdonk A.C.M., 2000. Lactoperoxydase: physico-chemical properties, occurence, mechanism of action and applications. British Journal of Nutrition, 84 suppl.1: S19-S25

- Landrock A.H., Proctor B.E., 1951. A new graphical interpolation method for obtaining humidity equilibrum data, with a special reference to its role in food packaging studies. Food Technology, 5 (8):332-340

- Law B.A., John P., 1981. Effect of the lactoperoxidase bactericidal system on the formation of the electrochemical proton gradient in *Escherichia coli*. Microbiology Letters, 10: 67-70

- Lee S.J., Rosenberg M., 2000. Microencapsulation of theophylline in whey proteins: effects of core-to-wall ratio. International Journal of Pharmaceutics, 205 (1-2): 147-158

- Maa Y.F., Hsu C., 1996. Liquid-liquid emulsification by static mixers for use in microencapsulation. Journal of Microencapsulation, 13 (4): 419-433

- Magnet T., 1997. Pelliculage en lit fluidisé. Glatt Pharmatech, Dijon. Session de formation Archimex, Paris.

- Man Y.B.C., Irwandi J.,Abdullah W.J.W. 1999. Effect of different types of maltodextrin and drying methods on physico-chemical and sensory properties of encapsulated durian flavour. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79 (8): 1075-1080

- Marcozzi G., Di Domenico C., Spreti N., 1998. Effects of surfactants on the stabilization of the bovine lactoperoxidase activity. Biotechnology Progress, 14: 653-656

- Marcussen E. & Markussen E., 1993. Encapsulation of industrial enzymes. In "Encapsulation and Controlled Release", Ed. Karsa & Stephenson, Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park Cambridge: 163-172

- Michaels A.S., 1965. Polyelectrolyte Complexes. Industrial and Engineering Chemistry, 57 (10): 32-40.

- Mickelson M.N., 1979. Antibacterial action of lactoperoxydase thiocyanate hydrogen peroxide on *Sterptococcus agalactiae*. Applied and Environmental Microbiology, 38 (5): 821-826

- Mitsuhiko O., Katsuhiko A., Toyoki K., 1999. Activity and stability of glucose oxidase in molecular films assembled alternately with polyions. Journal of Bioscience and Bioengineering, 17 (1): 69-75

- Moirano A.L., 1977. Sulfated seaweed polysaccharides. In "Food colloids" ed. H.D. Graham, The Avi Publishing company, INC, Westport, Connecticut, 347-381

- Mortenson S. & Houmand S., 1975. Particle formation and agglomeration in a spray granulator. International Fluidization Conference, California

- Nath S. & Satpathy G. R., 1998. A systematic approach for investigation of spray drying processes. Drying Technology, 16 (6): 1173-1193.

- O'Brien P.J., 2000. Peroxidases. Chemico-Biological Interactions, 129: 113-119

- Palmieri S., Lauri D., Wehrle P., 1996. Gelatin-Acacia Complex Coacervation as a method for ketoprofen microencapsulation. Drug Development and Industrial Pharmacy, 22 (9-10): 951–957.

- Parthasarathy R.V., Martin C.R., 1994. Synthesis of polymeric microcapsule arrays and their use for enzyme immobilization. Nature, 369 (6478): 298-301

- Phillips G.O., 1998. Acacia gum (Gum Arabic): a nutritional fibre, metabolism and calorific value. Food additives and Contaminants, 15 (3): 251-264

- Pierre G. & Veit P., 1996. Plan de surveillance de la contamination par Listeria monocytogenes des aliments distribués. Résultats des plans 1993 et 1994. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire (45) : 195-197

- Pilkington H., Margaritis A., Mensour N., Sobczak J., Hancock I., Russell I., 1999. Kappa-carrageenan gel immobilization of lager brewing yeast. Journal of the Institute of Brewing, 105 (6): 398-404

- Pitcher W.H., 1980. Applications and potential of immobilized glucose oxidase-catalase. In "Immobilized Enzymes fo Food Processing" Ed. Pitcher, CRC Press, Boca Raton, Florida: 196-200

- Poncelet D., 2001. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. Annals of the New York Academy of Sciences, 944: 74-82

- Poncelet D., Poncelet-De Smet B., Beaulieu C., Neufeld R.J., 1993. Scale up of gel bead and microcapsule production in cell immobilization. In "Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization", ed. M.F.A. Goosen, CRC Press, Boca Raton, USA, 113-142

- Pons M.N., Vivier H., Dodds J.A., 1997. Particle shape characterization using morphological descriptors, Particle & Particle Systems Characterization, 14 (272-2): 77

- Popper L. & Knor D., 1997. Inactivation of yeast and filamentous fungi by the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system. Nahrung, 41 (1): 29-33

- Portmann A. & Auclair J.E., 1959. Relation entre la lacténine L2 et la lactoperoxydase. Lait 39 : 147-158

- Prüße U. & Vorlop K.D., 1999. Production of microcapsules by jet-cutting. In proceeding of TTC-Workshop Particle Coating for Food & Neutraceuticals, Binzen, Germany

- Rando D., Kohring G.W., Giffhorn F., 1997. Production, purification and characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of *Penicillium pinophilium*. Applied Microbiology and Biotechnology, 48 : 34-40

- Ré M.I., 1998. Microencapsulation by spray drying. Drying technology, 16 (6): 1195-1236

- Reiter B. & Härnulv B.G., 1984. Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical application. Journal of Food Protection, 47: 724-732

- Reiter B., 1978. Review of non specific antimicrobial factors in colostrums. Annales de Recherches Vetérinaires, 9 (2): 205-224

- Reiter B., Marshall V.M.E., Björck L., Rosén G., 1976. Nonspecific bactericidal activity of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system of milk against *Escherichia coli* and some Gram negative pathogens. Infection and Immunity, 13 (3): 800-807

- Revol-Junelles A.M., Boussouel N., Ramet J.P., Millière J.B., 2001. Antibacterial activities of lactoperoxidase system (LPS) modified by I^- and IO_3^- anions. Milchwissenschaft

- Roberts A. G., Shah K. D., 1975. The large scale application of prilling. The Chemical Engineer, Dec 748 – 750.

- Rodriguez E., Tomillo J., Nunez M., Medina M., 1997. Combined effect of bacteriocin – producing lactic acid bacteria and lactoperoxidase systemactivation on *Listeria monocytogenes* in refrigerated raw milk. Journal of Applied Microbiology, 83: 389-395

- Sanchez C., Zuniga-Lopez R., Schmitt C., Despond S., Hardy J., 2000. Microstructure of acid induced skim milk-locust bean gum-xanthane gels. International Dairy Journal, 10: 199-212

- Sato K., Dosako S., Nakajima I., Ido K., 1992. Effects of ionic strength on thermostability of lactoperoxidase. Bioscience, Biotechology and Biochemistry, 56 (12): 2054-2055

- Shandholm M., Ali-Vehmas T., Kaartinen L., Junnika M., 1988. Glucose oxidase (GOD) as source of hydrogen peroxide for the lactoperoxidase (LPO) system in milk: antimicrobial effect of the GOD – LPO system against *Mastitis pathogens*. Journal of Veterinary Medicine series B, B35: 346-352

- Shelukar S., Ho J., Zega J., Roland E., Yeh N., Quiram D., Nole A., Katdare A., Reynolds S., 2000. Identification and characterization of factors controlling tablet coating uniformity in a Wurster coating process. Powder Technology, 110: 29-36

- Sheu T.Y., Marshall R.T., Heymann H., 1993. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. Journal of Dairy Science, 76 (7): 1902-1907

- Shindler J. S. & Bardsley G., 1975. Steady-state kinetics of lactoperoxidase with ABTS as chromogen. Biochemical and Biophysical Research Communication, 67 (4) : 1307-1312

- Siragusa G.R. & Johnson M.G., 1989. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by the lactoperoxydase-thiocyanate-H_2O_2 antimicrobial system. Applied and Environmental Microbiology, 55 (11): 2802-2805

- Stephen A.M., Churms S.C., Vogt D.C., 1990. Extrudate gums in « Methods in plant chemistry, 2 : carbohydrates », Dey P.M. éd., Academic press, Londres, 483-522

- Subhashchandra S.C., Bhaskar N., Bhandry M.M., Raghunath B.S., 1996. Effect of film-forming gums in the preservation of salted and dried Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta Cuvier*). Journal of Food Agriculture, 70: 453-460

- Swoboda B.E. & Massey V., 1966. On the reaction of the glucose oxidase from *Aspergillus niger* with bisulfite. The Journal of Biological Chemistry, 241 (14): 3409-3416

- Teunou E. & Fitzpatrick J.J., 2000. Effect of storage time and consolidation on food powder flowability. Journal of Food Engineering, 43: 97-101

- Thevenet, 1997. Les gommes d'acacias : agents naturels d'encapsulation, session de formation : enrobage et microencapsulation, ARCHIMEX, PARIS.

- Thomas E.L., 1985 In "The lactoperoxydase system: biochemistry and biological significance" Ed. Pruitt & Tenovuo, Marcel Dekker New York, Basel

- Thomas E.l. & Aune T.M., 1978a. Susceptibility of *Escherichia coli* to bactericidal action of lactoperoxidase, peroxide and iodide or thiocyanate. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 13 (2): 261-265

- Thomas E.l. & Aune T.M., 1978b. Lactoperoxidase, peroxide, thiocyanate antimicrobial system: correlation of sulfhydryl oxidation with antimicrobial action. Infection and Immunity, 20 (2): 456-463

- Thomas W.R., 1997. Carrageenan. In "Thickening and gelling agents for food" second edition, Ed. A. Imeson, Blakie Academic & Professional, London. 45-59

- Thomasin C., Merkle H.P., Gander B.A., 1997. Physico-chemical parameters governing protein microencapsulation into biodegradable polyesters by coacervation. International Journal of Pharmaceutics, 147: 173-186

- Turner B. & Levey L., 1993. Small packages that deliver big ideas: an inside look into microcapsule technology. In "Encapsulation and Controlled Release", Ed. Karsa & Stephenson, Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park Cambridge, 98-101

- Uemura Y., Hamakawa N., Yoshizawa H., Ando H., Ljichi K., Hatate Y., 2000. Effect of calcium alginate coating on the performance of immobilized yeast cells in calcium alginate beads. Chemical Engineering Communications, 177: 1-14

- Van Aken B., Ledent P., Naveau H., Agathos S.N., 2000. Co-immobilization of manganese peroxidase from *Phlebia radiata* and glucose oxydase from *Aspergillus niger* on porous silica beads. Biotechnology Letters, 22:641-646

- Van Hooijdonk A.C.M., Kussendrager K.D., Steijns J.M., 2000. In vivo activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. British Journal of Nutrition, 84 suppl. 1: S127-S134

- Vanhanen M., Tuomi T., Tükkainen U., Voutilainen R., Nordman H., 2000. Risk of enzyme allergy in the detergent industry. Occupational and Environmental Medicine, 57 (2): 121-125

- Vasseur J., 1999. Propriétés d'usage : la coulabilité des poudres. Récents Progrès en Génie des Procédés, 63 (13) : 99-104

- Vorlop K.D.& Prüße U., 2001. Production of microcapsules by jet-cutting. In proceeding of TTC-Workshop Particle Coating for Food & Neutraceuticals, Binzen, Germany

- Whistley R.L., 1993. Exudates gums. In "Industrial gums, polysaccharides and their derivatives", third edition. Edition Academic Press, INC: 309-339

- White F.H. & Portno A.D., 1978. Continious fermentation by immobilized brewers yeast. Journal of the Institute of Brewing, 84: 228-230

- Williams P.A., Phillips G.O., Randall R.C., 1990. Structure-function relationships of gum arabic, Gums and Stabilisers for the Food Industry 5, édition IRLPRESS.

- Wolfson L.M. & Sumner S.S., 1993. Antimicrobial activity of the lactoperoxidase system. Journal of Food Protection, 56: 887-892

- Wong A.C.Y., 2000. Characterisation of flowability of glass beads by bulk densities ratio. Chemical Engineering Science, 55: 3855-3859

- Zajack M., Björck L., Claesson O., 1981. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Bacillus cereus*. Milchwissenshaft, 36 (7): 417-418

- Zapico P., Gaya P., De Paz M., Nuñez M., Medina M., 1991. Influence of breed, animal and days of lactation on lactoperoxidase system components in goat milk. Journal of Dairy Science. 74: 783-787

- Zapico P., Gaya P., Nuñez M., Medina M., 1990. Lactoperoxidase and thiocyanate contents of goat's milk during lactation. Letters in Applied Microbiology. 11: 90-92

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur Jean-François CAVIN, Professeur, Université de Bourgogne, ENSBANA, Dijon
Monsieur DODDS John, Professeur, Ecole des Mines d'Albi

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame JACQUOT Muriel

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

«Encapsulation de systèmes enzymatiques d'intérêt alimentaire».

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **"PROCEDES BIOTECHNOLOGIQUES ET ALIMENTAIRES"**

Fait à Vandoeuvre le, 24 juin 2002
Le Président de l'I.N.P.L.,
L. SCHUFFENECKER

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANŒUVRE CEDEX

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Cette étude a permis la mise au point d'une microbille sèche, modulable, contenant un système antimicrobien naturel, multienzymatique complet (enzymes et substrats). La microbille est à activité contrôlée, activée par le contact d'une surface humide. Le système lactoperoxydasique (LPS) associé à un générateur enzymatique de peroxyde d'hydrogène à été choisi comme modèle d'étude. L'activité antimicrobienne a été testée contre *Listeria monocytogenes* et contre 7 souches d'altération et de contamination des produits marins. La microbille a été produite en deux phases : la réalisation et la caractérisation des noyaux contenant les substrats puis le pelliculage des enzymes et de deux enrobages de régulation autour de ces noyaux. Différentes concentrations des composés ainsi que des variantes du système multienzymatique modèle ont été testées. Plusieurs méthodes de production ont été éprouvées et le choix résulte de l'étude des propriétés physico-chimiques des noyaux et des microbilles. L'atomisation s'est révélée la méthode la plus adaptée à la production des noyaux et les études de dissolution et d'activité anti-*Listeria* ont mis en relief l'intérêt de l'addition d'un enrobage supplémentaire de régulation. Les microbilles se sont avérées actives contre toutes les souches bactériennes testées et la formulation mise au point a permis une bonne stabilisation des activités enzymatiques. Ce travail présente donc un double intérêt. Il a tout d'abord démontré la faisabilité de l'encapsulation du LPS qui, ainsi stabilisé, peut trouver de multiples applications en industrie agroalimentaire, cosmétique ou chimique. De plus, le concept de la microbille est intéressant car il peut facilement être extrapolé à d'autres combinaisons enzymatiques.

" Encapsulation of enzymatic systems for food industry "

Our research is aimed at developing one dried modular microbead, which contains a natural antimicrobial complete multienzymatic system (enzymes and substrates). The microbead activity can be controlled, and the bead can be activated when interacting with a wet surface. The lactoperoxydase system (LPS), associated with an enzymatic generator of hydrogen peroxide, has been chosen as a model. Antibacterial activity has been tested against Listeria monocytogenes and 7 alteration or contamination strains of fish products. The microbead has been produced in two steps: first, preparation and characterisation of cores containing the substrates; and second, coating of the enzymes and two regulating layers around these cores. Various concentrations of components as well as several enzymatic models have been tested. A series of methods for microbead production has been studied and as a result the consequence of physic-chemistry studies of cores and microbeads have been carried out. Spray drying has been proved to be the most efficient method for core production. Dissolution tests and anti-Listeria activities have emphasized the importance of the regulating coating. The microbead appeared to be active against all bacterial strains tested and the obtained formulation provided a good stabilisation of the enzymatic activity. In conclusion, this research has a double interest. First, it shows the encapsulation feasibility of LPS, which in this form can find a lot of industrial applications in food, cosmetic or chemical industries. Secondly, the microbead concept itself is also of interest because it can be easily extrapolated to any other enzymatic combinations.